

Aus der Klinik für Anästhesiologie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Hahnenkamp)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Zum Einfluss von Eisenchelatoren auf die intestinale Mikrozirkulation
bei systemischer Inflammation und experimenteller Sepsis**

Inaugural - Dissertation
zur

Erlangung des akademischen
Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med)

der
Universitätsmedizin
der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2017

vorgelegt von: Lisanne Kostek
geb. am: 14.09.1987
in: Demmin

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Usichenko

2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Lehmann

Ort, Raum: Greifswald, J02.16, DZ 7

Tag der Disputation: 01.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Sepsis - Definitionen	3
2.2	Die intestinale Mikro- und Makrozirkulation	6
2.3	Sepsis - Pathophysiologie	8
2.3.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion	10
2.3.2	Oxidativer Stress	11
2.4	Sepsismodelle	12
2.5	Eisenhomöostase	14
2.5.1	Biologische Bedeutung	14
2.5.2	Eisenstoffwechsel	15
2.5.3	Eisenchelatoren	17
3	Fragestellung	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Material	20
4.1.1	Versuchstiere	20
4.1.2	Substanzen	20
4.2	Versuchsablauf	21
4.2.1	LPS-Modell	22
4.2.2	CASP-Modell	22
4.3	Gruppeneinteilung	23
4.4	Versuchsdurchführung	24
4.4.1	Anästhesie und Monitoring	24
4.4.2	Chirurgische Präparation	25
4.4.3	CASP-Operation	26
4.5	Intravitalmikroskopie	28
4.5.1	Technische Daten und Geräte	28
4.5.2	Durchführung	29
4.6	Versuchsauswertung	31
4.6.1	Temporär adhärente Leukozyten	31
4.6.2	Fest adhärente Leukozyten	32
4.6.3	Funktionelle Kapillardichte	32
4.7	Histologische Präparate	32
4.7.1	Auswertung	33
4.8	Statistik	35
5	Ergebnisse	36
5.1	LPS-Modell	36
5.1.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion	36
5.1.2	Funktionelle Kapillardichte	39
5.2	CASP-Modell	41
5.2.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion	41
5.2.2	Funktionelle Kapillardichte	44
5.3	Histologische Präparate	45
6	Diskussion	47
6.1	Intravitalmikroskopie im LPS-Modell	47
6.1.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion	47
6.1.2	Funktionelle Kapillardichte	51
6.2	Intravitalmikroskopie im CASP-Modell	53
6.2.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion	53

6.2.2	Funktionelle Kapillardichte	56
6.3	Histologie	56
6.4	Limitationen	58
7	Zusammenfassung	61
8	Literaturverzeichnis	63
9	Eidesstattliche Erklärung	72
10	Danksagung	73
11	Lebenslauf.....	74

|

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Intestinale Mikroanatomie	6
Abb. 2	Phasen der Leukozytenmigration	11
Abb. 3	Regulation der Eisenhomöostase	16
Abb. 4	Versuchsablauf: LPS-induzierte Sepsis	22
Abb. 5	Versuchsablauf: CASP-induzierte Sepsis	23
Abb. 6	Operationssitus während der CASP-Chirurgie	27
Abb. 7	Versuchsaufbau	29
Abb. 8	Hanging Drop im Versuchsmodell	30
Abb. 9	Histologisches Präparat des Dünndarms, Grad 0	33
Abb. 10	Histologisches Präparat des Dünndarms, Grad 1	34
Abb. 11	Histologisches Präparat des Dünndarms, Grad 2	34
Abb. 12	Anzahl temporär adhärenter Leukozyten in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	36
Abb. 13	Anzahl temporär adhärenter Leukozyten in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	37
Abb. 14	Anzahl fest adhärenter Leukozyten in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	38
Abb. 15	Anzahl fest adhärenter Leukozyten in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	38
Abb. 16	Funktionelle Kapillardichte in der Lamina muscularis des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	40
Abb. 17	Funktionelle Kapillardichte in der Lamina mucosa des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie	40
Abb. 18	Anzahl temporär adhärenter Leukozyten in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	41
Abb. 19	Anzahl temporär adhärenter Leukozyten in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	42
Abb. 20	Anzahl fest adhärenter Leukozyten in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	43
Abb. 21	Anzahl fest adhärenter Leukozyten in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	43
Abb. 22	Funktionelle Kapillardichte in der Lamina muscularis des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	44
Abb. 23	Funktionelle Kapillardichte in der Lamina mucosa des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis	45
Abb. 24	Ausmaß der mukosalen Schädigung	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Sequential Organ Failure Assessment Score	5
Tab. 2:	Histologische Einteilung der Mukosaschädigung nach Chiu	33

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BC	British Columbia
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA	California
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CCAC	Canadian Council on Animal Care
CD	Cluster of Differentiation
CLP	Cecal Ligation and Puncture
cm	Zentimeter
CON	Kontrolle
d	Tag
DFX	Deferasirox
dl	Deziliter
DMT	Divalent Metalion Transporter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
FCD	Funktionelle Kapillardichte
Fe	Eisen
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
FPN	Ferroportin
G	Gauge
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
°C	Grad Celsius
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
Inc.	Incorporated
INF- γ	Interferon- γ

i.p.	intraperitoneal
IRP	Iron Regulatory Protein
i.v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie
kgKG	Kilogrammkörpergewicht
l	Liter
LBP	Lipopolysaccharide-Binding-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OH	Hydroxidion
ON	Ontario
OP	Operation
p	Statistische Signifikanz
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMP's	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI ₂	Prostacyclin
%	Prozent
QC	Quebec
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA-Score	Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TF	Transferrin
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V.	Vena
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
v. Chr.	vor Christus
vs.	versus

1 Einleitung

Sepsis beschreibt eine dysregulierte systemische Immunantwort des Organismus auf eine Infektion, welche zu potenziell lebensbedrohlichen Komplikationen wie Organdysfunktion und Multiorganversagen führen kann. Häufig sind Infektionen der Lunge (40%), des Abdomens (30%) und des Urogenitaltraktes (10%) ursächlich. [1]

Trotz großer Fortschritte in der Erforschung der Pathophysiologie der Sepsis und der hierbei simultan aktivierten pro- und antiinflammatorischen Kaskaden, bleibt weiterhin unklar, wie genau sich aus der primär physiologischen Abwehrreaktion des Organismus eine überschießende Immunantwort mit Dysbalance beider Systeme entwickelt. Die hohe klinische Relevanz der Sepsis ergibt sich aus der Komplexität der Pathomechanismen mit Dysfunktion des Immun-, Komplement- und Gerinnungssystems, mikro- und makrozirkulatorischen Störungen und negativer Beeinflussung des metabolischen und endokrinen Systems.

Weltweit erkranken jährlich mehr als 30 Millionen Menschen an Sepsis. Ihre hohe Mortalität (33-35%) und eine durch demographische Entwicklung, Immunsuppression und zunehmende Antibiotikaresistenzen weiterhin steigende Inzidenz, stellen trotz verbesserter Therapieoptionen eine immense Herausforderung an Medizin und Gesundheitssystem dar. [1]

Auf deutschen Intensivstationen betrug gemäß der INSEP Studie am 04. November 2013 die Punktprävalanz der schweren Sepsis und des septischen Schocks 17,9%, die Inzidenz lag bei 11,6 auf 1000 Intensivtherapie-Tage. [2] Hieraus ergibt sich ein weiterhin hoher Bedarf an intensivierter Forschungsarbeit hinsichtlich effektiver Therapieansätze zur Verbesserung des Patientenoutcomes.

Die Krankenhauskosten pro Patient verdoppeln sich mit Auftreten einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks, so dass auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive derartige Untersuchungen nicht unbedeutend sind. [3]

Gemäß den internationalen Guidelines von 2016 stützt sich das therapeutische Management der Sepsis auf vier Säulen: frühzeitige antiinfektiöse Therapie, Fokussuche und Fokussanierung, supportive Therapie (z.B. intravenöse Volumengabe oder bei septischen Schock Verabreichung von Vasopressoren) und Unterbrechung des Toxin-Mediator-Netzwerkes (z.B. durch antiinflammatorische oder immunmodulatorische Medikamente). Alle weiteren Therapieansätze werden als adjuvante Sepsistherapie bezeichnet. [4]

Als essentielles Spurenelement nimmt Eisen aufgrund seiner Redox-Eigenschaften eine besondere Rolle im menschlichen Organismus ein. Als Bestandteil von Proteinen und Enzymen ist es an einer Vielzahl von biochemischen Reaktionen, wie beispielsweise Sauerstoff- oder Elektronentransport beteiligt. [5]

So ist die Eisenhomöostase auch bedeutend für die systemische Immunantwort bei Sepsis. Dabei spielt Eisen eine kontroverse Rolle: Einerseits katalysiert Eisen im Rahmen der Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) – ein potenter Mediator zur Eliminierung von Bakterien durch Immunzellen. Allerdings kann eine überschießende Bildung von ROS zu Zell- und Gewebeschäden führen. [6] [7] Andererseits reagiert der Körper bei Infektion mit einer Adaptation des Eisenhaushaltes in Form einer Herabregulierung des frei verfügbaren Eisens um bakterielles Wachstum zu verhindern. [8]

Auf dieser Grundlage untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss von Eisenrestriktion auf die systemische Inflamationsreaktion bei Sepsis *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie der Leukozytenaktivierung und Kapillarperfusion in der intestinalen Mikrozirkulation in zwei experimentellen Sepsismodellen an der Maus.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Sepsis - Definitionen

Die erste schriftliche Erwähnung der Sepsis ist auf Papyrusfunden des alten Ägyptens um 1600 v. Chr. zurückzuführen. Im 4. Jahrhundert v. Chr. wurde Sepsis im Corpus Hippocraticum als „*Zerfall organischer Substanz*“ beschrieben. [9]

Mehr als 2000 Jahre vergingen, bis mehr über Ursprung und Prävention der Sepsis herausgefunden werden konnte. 1847 erkannte Ignaz Semmelweis, dass durch das Händewaschen der auf der Entbindungsstation tätigen Ärzte das Auftreten der Puerperalsepsis drastisch reduziert werden konnte. [9]

Hugo Schottmüller formulierte 1914: „*Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen.*“ [9]

Die erste Konsensusdefinition der Sepsis wurde 1992 durch das American College of Chest Physicians und die Society of Critical Care Medicine in Form eines Stufensystems wie folgt festgelegt: [9]

- **Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)** (Mindestens 2 der folgenden Kriterien mussten vorliegen. Sowohl infektiöse Genese [z.B. Bakteriämie, Fungämie, Virämie] als auch nicht infektiöse Genese [z.B. Trauma, Verbrennung, Pankreatitis] ist möglich.)
 - Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)
 - Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
 - Tachypnoe (Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 33 \text{ mmHg}$)
 - Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild
- **Sepsis** (SIRS mit nachgewiesenem oder vermutetem Infektfokus)
- **Schwere Sepsis** (Sepsis mit Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotonie, hierbei musste mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein.)
 - Akute Enzephalopathie

- Relative oder absolute Thrombozytopenie
- Arterielle Hypoxämie
- Oligurie
- Metabolische Azidose

- **Septischer Schock**
(Schwere Sepsis mit therapierefraktärer Hypotonie mit mindestens eines der folgenden Kriterien)
 - Systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg oder mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) ≤ 65 mmHg für mindestens eine Stunde
 - Vasopressoreinsatz trotz adäquater Volumensubstitution um die erforderlichen Zielblutdruckwerte zu erreichen. [10]

- **Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS)**
(Kompensierte latente Minderperfusion mehrerer Organsysteme mit Mikrozirkulationsstörungen und Endothelschäden.)

- **Multiorganversagen (MOV)**
(Terminales Stadium des MODS mit invasiv medikamentös oder apparativ unterstützungspflichtiger Funktionseinschränkung von mindestens 3 Organsystemen.) [11]

2016 wurde auf der dritten internationalen Konsensuskonferenz (Sepsis-3) die derzeit gültige Definition der Sepsis beschlossen. Ziel war hierbei, spezifischere Kriterien mit höherer klinischer Relevanz zu formulieren. Vorrangig soll die prognostische Aussagekraft verbessert werden, welche durch die SIRS-Kriterien nur ungenügend abgebildet werden konnte.

Sepsis wird aktuell als „*lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Antwort des Körpers auf eine Infektion*“ definiert.

Der **SOFA-Score** (Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score) umfasst 6 organbezogene Kriterien (siehe Tabelle 1), ein ansteigender Score korreliert mit erhöhter Mortalität. Von einer Organdysfunktion ist ab einem SOFA-Score ≥ 2 auszugehen.

Tab. 1 Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score [12]

Score					
System	0	1	2	3	4
Atmung paO ₂ /FiO ₂ [mmHg]	≤ 400	< 400	< 300	< 200 mit Beatmung	< 100 mit Beatmung
Gerinnung Thrombozytenzahl x 10 ³ /μl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber Bilirubin [mg/dl]	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
Herz-Kreislauf MAP [mmHg] Katecholamindosen [μg/kgKG/min] über mindestens 1h	≥ 70	< 70	Dopamin < 5 oder Dobutamin	Dopamin 5,1 - 15 oder Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamin >15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1
Zentrales Nervensystem GCS	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Nieren Kreatinin [mg/dl] Urinausscheidung [ml/d]	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9 < 500	> 5 < 200

Zur schnellen, rein klinischen Risikostratifizierung von Patienten mit vermuteter Infektion dient vereinfachte **qSOFA-Score** (quick SOFA-Score), welcher folgende drei Kriterien erfasst:

- Atemfrequenz ≥ 22/min
- Veränderter Bewusstseinszustand
- Systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg

Der **Septische Schock** wird nun als Sepsis definiert mit persistierender Hypotonie und Katecholaminbedarf um einen MAP ≥ 65 mmHg aufrechtzuerhalten und dem Vorliegen von erhöhten Serum-Laktatwerten > 2 mmol/l trotz adäquater Volumensubstitution. [12] [13]

2.2 Die intestinale Mikro- und Makrozirkulation

Dem Hepatosplanchnikusgebiet wird in der Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens seit langer Zeit eine zentrale Bedeutung zugeschrieben (der Darm als „Motor der Sepsis“). Dies resultiert unter anderem aus anatomischen und metabolischen Besonderheiten der intestinalen Mikrozirkulation. [14] [15]

Zur Mikrozirkulation zählen allgemein Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einem maximalen Durchmesser von bis zu $100\ \mu\text{m}$. Hier findet neben dem Gasaustausch, eine Verteilung von Nährstoffen, der Abtransport von Stoffwechselendprodukten, der Wärmetransport, die Regulation der Leukozytenadhäsion- und Migration und teilweise die Kontrolle der Gerinnungshomöostase statt. Wobei dem Gefäßendothel im engen Kontakt zur glatten Gefäßmuskulatur der Metarteriolen eine zentrale Rolle bei der Steuerung dieser verschiedenen Funktionen zukommt. [16]

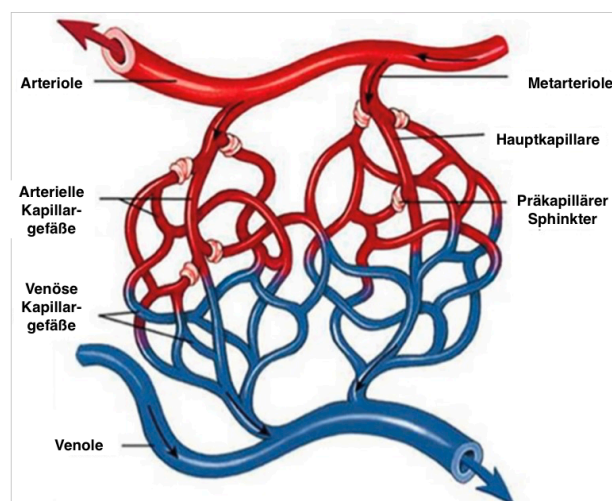


Abb. 1 Intestinale Mikroanatomie modifiziert nach Do Amaral Tafner et al. [17]

Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Blutfluss des Hepatosplanchnikusgebietes 30% des Herzzeitvolumens, dabei ist die Perfusion von Leber und Dünndarm 50% höher als die von Magen und Kolon. 80 % des intestinalen Blutvolumens verteilen sich auf die Mikrozirkulation der Mukosa und 20% auf Submukosa und Muskularis-schicht. Die besondere Anatomie der Mikrogefäße des Darmes bedingt im Bereich der Zottenspitzen eine Gefahr für lokale Gewebeischämien, da der Sauerstoffaustausch im Gegenstromprinzip an der Basis der Zottenspitze zwischen Arteriole und Venole erfolgt. Leber und Darm weisen einen hohen Sauerstoffbedarf auf, bei nahezu kaum vorhandener Sauerstoffspeicherkapazität. [18]

Steigt nun im Rahmen einer Sepsis der Gesamtsauerstoffbedarf, muss das Sauerstoffangebot an diese Verhältnisse angepasst werden. Hierbei kommt es zur Umverteilung des Blutvolumens zugunsten lebenswichtiger Organe wie Herz und Gehirn, durch Minderperfusion peripherer Gewebe wie die des Intestinums.

Hypoxiebedingte Widerstandsänderungen im Kapillargebiet führen im Verlauf zur ausgeprägten Dysbalance zwischen Gefäßdilatation, vorrangig vermittelt durch Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI_2), und Gefäßkonstriktion vermittelt durch Angiotensin II, Adrenalin und Thromboxan A₂. Im Sinne eines circulus vitiosus bedingt dies eine Progredienz der Mikrozirkulationsstörung durch:

- Endothelschädigung
- Strukturelle Veränderungen der Erythrozyten mit geringerer Verformbarkeit
- Kapillarschädigung mit interstitiellem Ödem
- Steigerung der Leukozyten-Endothel-Interaktion
- Gerinnungsstörungen mit Mikrothromben.

Als Resultat dieser Veränderungen kommt es zum Zusammenbruch der intestinalen Mukosabarriere mit Translokation von Darmbakterien in die systemische Zirkulation und konsekutiver Aggravation des klinischen Bildes einer Sepsis. [19] [20] [21]

2.3 Sepsis - Pathophysiologie

Im Rahmen einer Infektion kommt es zunächst zu einer gerichteten, körpereigenen Abwehrreaktion mit dem Ziel der Elimination pathogener Keime. Können diese komplexen Abwehrkaskaden, zum Beispiel aufgrund einer bestehenden Immunschwäche oder durch eine große Anzahl hochpathogener Keime überwunden werden, kommt es zur Invasion von Mikroorganismen in die Blutbahn und ins umliegende Gewebe.

Hiervon abzugrenzen ist der physiologische, einer natürlichen Immunität dienliche Prozess der bakteriellen Translokation, einer speziellen Form der Invasion von Mikroorganismen aus dem Darm in die Blutbahn durch die intakte intestinale Barriere. Wird allerdings bei intestinaler Hypoperfusion, beispielsweise durch Trauma oder Sepsis, diese Barriere geschädigt, resultiert eine pathologische Überschwemmung des Organismus mit Darmkeimen. [22]

Die körpereigenen Abwehrkaskaden werden durch Bakterien, Viren oder Pilze ausgelöst: Zellen des Immunsystems erkennen die Pathogene über Pathogen-Associated Molecular Patterns – den sogenannten PAMP's, welche eine Freisetzung inflammatorischer Mediatoren bewirken. [23] Bei Gram-negativen bakteriellen Infektionen kommt dem Endotoxin eine besondere Bedeutung zu. Als amphiphiles Lipopolysaccharid ist es Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.

Gelangt Endotoxin in die Blutbahn wird es an Serumproteine gebunden, z.B. an das Bacterial Permeability-Increasing Protein (BPI), wodurch seine Toxizität neutralisiert werden kann. Wird seine Bindungskapazität jedoch durch eine zu große Masse von Endotoxin überschritten, erfolgt eine Assoziation mit dem Lipopolysaccharide-Binding-Protein (LBP), wodurch seine Toxizität gesteigert wird.

Über spezifische, hochaffine Endotoxinrezeptoren, den membranständigen CD 14-Rezeptoren auf Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und B-Lymphozyten) werden Veränderungen in der Proteinexpression getriggert.

Lösliche CD14-Proteine im Serum können sowohl die Endotoxinaktivität inhibieren, als auch als Komplex CD14-negative Zellen (Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen) aktivieren.

Über Toll-like-Rezeptoren (TLR) 4, welche Endotoxinrezeptorkomplexe binden, erfolgt schließlich eine intrazelluläre Signaltransduktion, wodurch unterschiedlichste Mediatoren werden freigesetzt.

In einer frühen Phase der Abwehrreaktion werden primäre Mediatoren, auch Aktivator genannt, welche Einwirkung auf neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Thrombozyten haben, freigesetzt.

Die klassischen proinflammatorischen Zytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukine (IL-1, IL-12, IL-18), Interferon- γ (INF- γ), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), aber auch natürliche Inhibitoren dieser Zytokine, wie der lösliche TNF-Rezeptor und der Interleukin-Rezeptorantagonist führen zur systemischen Hyperinflammation.

Proinflammatorische Zytokine verstärken folgende pathophysiologische Prozesse in der Sepsis:

- Eine erhöhte Anzahl und einen stärkeren Aktivierungsgrad von Zellen des angeborenen Immunsystems.
- Die Freisetzung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen durch Endothelzellen.
- Eine Induktion von Akute-Phase-Proteine in der Leber.
- Die Thrombozytenaktivierung mit konsekutiver Immuno- thrombose bis hin zur Verbrauchskoagulopathie (disseminierte intravasale Gerinnung) mit Beeinflussung der Mikrozirkulation durch thrombembolische Ereignisse und im Verlauf resultierende, lebensbedrohliche Blutungen.
- Eine Aktivierung des Komplementsystems (vorrangig Komplementfaktor C5a) führt zur Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS).
- Die Ausbildung eines „capillary leaks“ mit Austritt intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium, massive Ödembildung und einen resultierenden, intravasalen Volumenmangel. [24] [25]

Gleichzeitig werden reaktiv antiinflammatorische Kaskaden in Gang gesetzt, beispielsweise durch die Zytokine: IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13, welche immunsuppressiv als kompensatorisches Gegensystem wirken.

Ein Ungleichgewicht zwischen beiden Systemen führt zur Sepsis, wobei sowohl eine überschießende Proinflammation, als auch eine übermäßige endogene Immunsuppression auftreten kann und in einer eingeschränkten Adaptationsfähigkeit des Organismus resultiert. [26] [27] [19]

Im Verlauf der Sepsis führen finale Mediatoren wie Sauerstoffradikale, Stickoxid (NO), Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels und Proteasen unmittelbar zu funktionellen und strukturellen Schäden an Endothel und Parenchym, welche irreversible Organschäden verursachen können. [19]

Folgende Aspekte der Organdysfunktion ausgelöst durch eine Sepsis verstärken und unterhalten den weiteren prognostisch ungünstigen Verlauf und sind in ihrer Ausprägung bedeutsam für die Adaptationsfähigkeit des Organismus auf die beschriebenen Pathomechanismen:

- ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom) erfordert häufig maschinelle Beatmung, welche wiederum zur weiteren Lungengewebschädigung und Progression der systemischen Inflammation führen kann.
- Der Einsatz von Sedativa bei nichtinvasiver Beatmung kann sepsisassoziierte Enzephalopathie und Delir ungünstig beeinflussen.
- Dysfunktion des Immunsystems durch Breitspektrum-Antibiotikaeinsatz birgt die Gefahr nosokomialer Infektionen mit multiresistenten oder opportunistischen Erregern. [24]

Über diese Pathomechanismen kann es im Verlauf der Sepsis zum klinischen Endpunkt des Multiorganversagens kommen, der genaue Ablauf der Mechanismen ist jedoch noch nicht im Detail geklärt. Letztendlich sind es vor allem O₂-Angebots- und Verwertungsstörungen als Folge beeinträchtigter Makro- und Mikrozirkulationsverhältnisse und mitochondriale Dysfunktion, die zum Multiorganversagen und Tod führen.

2.3.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Im Rahmen der Immunreaktion auf einen infektiösen Fokus kommt es zur Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen in der Mikrozirkulation, dies geschieht über Expression von Adhäsionsmolekülen. Überwiegend in den postkapillären Venolen kommt es zum Austritt (Migration) von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutgefäßsystem ins umliegende Interstitium, entlang eines Chemokingradienten.

Die Leukozytenmigration und -sequestration umfasst mehrere Schritte an denen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle beteiligt sind.

- Temporäre Adhärenz

- Feste Adhärenz
- Transmigration

Im ersten Schritt „rollen“ neutrophile Granulozyten auf den Endothelzellen entlang, wodurch diese über verschiedene Selektine miteinander in Kontakt treten. Konstitutiv exprimiertes L-Selektin, ein Glykoprotein auf der Oberfläche der Leukozyten führt zur P-Selektin-Expression auf aktivierten Endothelzellen. Über E-Selektine, welche verzögert nach 4 bis 6 Stunden ihr Expressionsmaximum erreichen, erfolgt zunächst während des Rollens eine lockere Bindung.

Das feste Anheften (Adhäsion) von Neutrophilen an aktivierte Endothelzellen über leukozytäre Integrine (CD11/CD18) und endotheliale Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1) stellt den zweiten Schritt dar. Die Diapedese (Transmigration) durch das Endothel erfolgt schließlich über ein zusätzliches Adhäsionsmolekül (PECAM-1). [19] [28] [29]

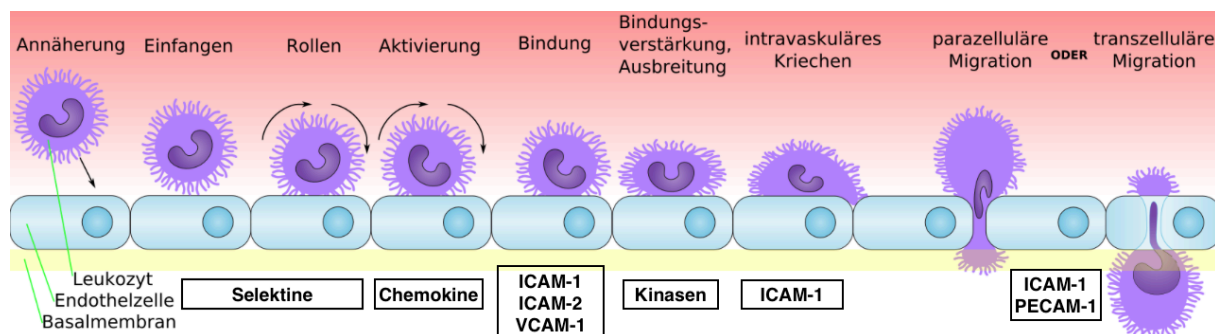


Abb. 2 Phasen der Leukozytenmigration und beteiligte Proteine modifiziert nach Ley et al. [30]

2.3.2 Oxidativer Stress

Als wichtige Gruppe terminaler Sepsismediatoren kommt den reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) eine besondere Bedeutung zu. Im septischen Schock zeigt sich eine erhöhte ROS-Produktion mit verstärkter Lipidperoxidation, wohingegen die Konzentration von Antioxidantien im Plasma deutlich erniedrigt ist.

Definitionsgemäß weisen ROS ein ungepaartes Elektron auf oder haben andere oxidierende Eigenschaften. Im septischen Geschehen relevant sind vor allem das Superoxidanion (O_2^-), das Hydroxylradikal (OH^\bullet) und das Stickoxid (NO). Freie Radikale

entstehen durch aktivierte Mediatorzellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen), aber auch durch Hypoxanthin, als Abbauprodukt von ATP.

Superoxidanionen werden zum einen in den Mitochondrien gebildet im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung, zum anderen entstehen sie als Nebenprodukt des Arachidonsäuremetabolismus. Durch Dismutation des Superoxidanions entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2), der Abbau erfolgt im Organismus zu Katalase und Peroxidase.

Reagieren wiederum Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid miteinander oder mit Eisen-(II)-haltigen Molekülen (Haber-Weiss- oder Fenton-Reaktion) wird das hochreaktive Hydroxylradikal ($\text{OH}\bullet$) gebildet.

Außerdem kann durch Reaktion von Superoxidanionen mit Stickoxid das Oxidans Peroxinitrit entstehen.

Diese Verbindungen wirken durch den oxidativen Stress toxisch und können auf Zellmembran, Zytosol, Zellkern oder Mitochondrien einwirken, wodurch Gene in den Zielzellen über Kinasenkaskaden aktiviert oder über Proteintyrosinphosphatasen inaktiviert werden können. Des Weiteren erfolgt die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher über Enzyminduktion entweder zur Zellschadenreparatur oder aber zur Apoptose führt. [19] [31]

2.4 Sepsismodelle

Mit einem tierexperimentellen Sepsismodell wird versucht pathophysiologische Veränderungen zu erzielen, welche dem klinischen Bild einer Sepsis im menschlichen Organismus gleichen.

Grundsätzlich lassen sich diese Modelle in zwei unterschiedliche Gruppen einteilen.

Einerseits sind Modelle bekannt, in denen Endotoxin, als Zellmembranbestandteil Gram-negativer Bakterien über unterschiedliche Applikationswege verabreicht wird. Zum anderen sind Modelle mit vitalen Infektionserregern, welche entweder von exogen in einen Organismus eingebracht werden, oder endogen vom Organismus selbst freigesetzt werden, etabliert.

In der praktischen Umsetzung zur validierten Ergebniserhebung weisen die verschiedenen Sepsismodelle jedoch unterschiedliche Vor- und Nachteile auf, die in ihrer

Summe in der entsprechenden Fachliteratur, teilweise kontrovers diskutiert werden. [32]

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei unterschiedliche Tiermodelle der Sepsis verwendet. Da in der ersten Phase die erstmalige *in vivo*-Gabe eines neuen Eisenchelators und dessen möglicher Einfluss auf eine Entzündungsreaktion untersucht werden sollte, induzierten wir mittels LPS eine systemische Inflammation. Dies reflektiert jedoch nur die primär angeborene Immunreaktion auf LPS und nicht auf einen infektiösen Fokus, wobei die Immunantwort rasch nach Applikation einsetzt. Der zeitliche Vorteil gegenüber anderen Sepsismodellen, bei gleichzeitig dennoch etabliertem Stellenwert in der Sepsisforschung, begründete unsere Entscheidung für dieses Modell. [33]

[34]

In der zweiten Phase wurde ein Sepsismodell verwendet, welches dem klinischen Bild einer Peritonitis, beispielsweise nach Darmperforation entspricht. Das klassische, seit über 30 Jahren etablierte CLP-Modell (cecal ligation and puncture) wurde aufgrund einer relativ schlechten Quantifizierbarkeit des, aus dem Darmlumen zu einem bestimmten Zeitpunkt austretenden Darminhaltes, nicht verwendet. Wir entschieden uns zur Durchführung des CASP-Modells (Colon Ascendens Stent Peritonitis), bei welchem, zur besseren Quantifizierbarkeit, ein Stent im Kolon die kontinuierliche Abgabe einer konstanten Menge Faeces gewährleisten soll. [35] [34]

2.5 Eisenhomöostase

2.5.1 Biologische Bedeutung

Eisen ist das quantitativ bedeutendste Spurenelement im menschlichen Organismus. Dies ergibt sich aus seinen speziellen Redoxeigenschaften – es kann zwischen reduzierter Fe^{2+} -Form und oxidiertem Fe^{3+} -Form wechseln. Da Eisen meist in seiner oxidierten Form vorliegt, welche nur schwer wasserlöslich ist, muss es im Organismus an Proteine gebunden werden. Ist die Proteinbindungskapazität für Eisen im Körper gesättigt, führt ein Eisenüberschuss über die Fenton-Reaktion zur Bildung zelltoxischer Radikale:



Dies bedingt DNA-Schädigung, Proteinmodifikation und Lipidperoxidation und kann folglich Kaskaden der Inflammation aggravieren. [36] [37]

Gebunden an Proteine wirkt Eisen als wichtigster Sauerstoff- und Elektronentransporteur im Organismus. In Hämproteinen wird Eisen über ein Porphyringerüst gebunden, wobei dem Hämoglobin zur Bindung von molekularem Sauerstoff die größte Bedeutung zukommt. Cytochrom c und Cytochrom P450 als Bestandteile der Atmungskette sind essentielle Vertreter dieser Gruppe. Nichthämeisen-Proteine in denen Eisen meist über Schwefelzentren gebunden vorliegt, katalysieren beispielsweise als Schwefelcluster in der Atmungskette wichtige Reaktionsschritte. [36] [38]

Ein gesunder Mensch weist einen Gesamteisenbestand von 4-5g auf, welcher sich auf unterschiedliche Kompartimente verteilt. So liegt Eisen größtenteils (65 %) gebunden im Hämoglobin der Erythrozyten des Blutes vor, zu 4,5 % im Myoglobin der Muskulatur und zu 2% in weiteren Enzymen oder Cytochromen, die Reaktionen mit molekularem Sauerstoff (Cytochrome, Hydroxylasen, NO-Synthasen) oder Wasserstoffperoxid (Peroxidasen, Katalasen) katalysieren. Weitere 10% des Gesamtkörper Eisens verteilen sich auf Proteine, welche Eisen direkt über Peptidketten binden, zum Beispiel das Enzym Ribonukleotid-Reduktase, welches die Umwandlung von Ribonukleotiden in Desoxyribonukleotiden katalysiert. Dies bedingt den Einfluss des Eisens auf zellproliferative Prozesse im Allgemeinen und im Besonderen im Rahmen der Immunabwehr, da auch Bakterien zur Proliferation auf das Vorhandensein von Eisen angewiesen sind. [39] [40] [41]

2.5.2 Eisenstoffwechsel

Aufgrund der vielfältigen biologischen Bedeutung des Eisens ist eine ausgeglichene Eisenhomöostase für den Organismus von entscheidender Wichtigkeit.

Über verschiedene Mukosaproteine, wie DMT1, duodenales Cytochrom b, Ferritin und Ferroportin, wird Eisen aus dem Dünndarm resorbiert und seine Aufnahme über eine veränderte Proteinexpression reguliert. [38]

Eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Eisenstoffwechsels übernimmt hierbei das von der Leber synthetisierte Hormon Hepcidin, durch Bindung an das Ferroportin in der Mukosazelle führt es zu dessen Abbau und verminderter Eisenresorption im Intestinum. Stimulatoren der Hepcidinsekretion sind Eisenüberschuss und Inflammation über Interleukin-2 und vor allem Interleukin-6. Hypoxie hingegen hemmt in der Leber die Hepcidinsekretion und stimuliert die Eisenresorption. [36]

Im Blutplasma wird Eisen durch Bindung an Transferrin transportiert. In verschiedenen Geweben kann es zur Speicherung in gebundener Form an Ferritin oder Hämosiderin vorliegen. Ferritin wird als akute Phase Protein im Rahmen von Entzündungen und Leberzellschädigung sowie durch Tumorzellen vermehrt gebildet. Der zelluläre Eisenstoffwechsel wird maßgeblich durch eisenregulatorische Proteine (IRP-1 und IRP-2) moduliert, welche die Translation von Schlüsselproteinen zur Aufnahme, Speicherung und intrazellulären Eisenverwertung regulieren. [36] [39]

Im gesunden Organismus ist die Eisenausscheidung extrem gering, lediglich durch Regeneration von Epithelien und Schweißsekretion wird Eisen abgegeben, welches durch eine enterale Resorption von 1 bis 2 mg gedeckt werden kann. [42].

Eine Dysbalance der Eisenhomöostase, einerseits durch Eisenmangelzustände, welche sich meist aus Resorptionsstörungen oder chronischen Blutungen ergeben, oder andererseits durch chronische Eisenüberladung, beispielsweise im Rahmen genetischer Erkrankungen wie der Hämochromatose, führt zu umfangreichen Störungen der Zellfunktionen [36] [41] [43]

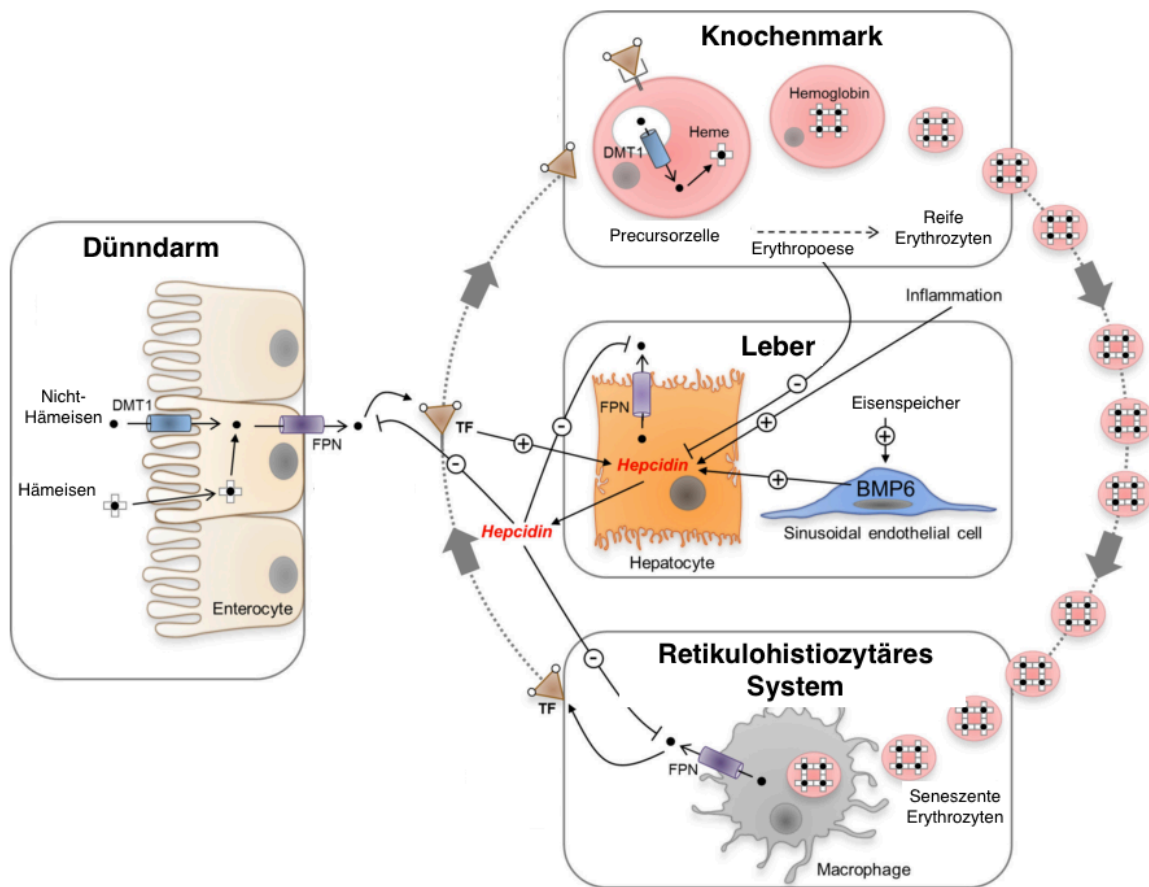


Abb. 3 Regulation der Eisenhomöostase modifiziert nach Knutson et al. [39]

Über die Enterozyten des Dünndarms erfolgt die Eisenaufnahme (Fe^{2+}), im Blutkreislauf wird es an Transferrin gebunden transportiert (Fe^{3+}). Im Knochenmark wird Transferrin von Precursorzellen zur Hämoglobinsynthese internalisiert und ein Großteil des Eisens gelangt über reife Erythrozyten in den Blutkreislauf. Das Hämoglobin der seneszenten Erythrozyten wird über Makrophagen der Leber, der Milz und des Knochenmarks "recycelt".

Transferrinspiegel im Plasma, hepatische Eisenspeicher (detektiert über Lebersinusoidzellen) und Inflammation regulieren die Hepcidinproduktion.

BMP6: bone morphogenetic protein 6, DMT1: divalent metalion transporter-1, FPN: Ferroportin, TF: Transferrin

2.5.3 Eisenchelatoren

Eisenchelatoren sind organische oder anorganische Verbindungen mit zwei oder mehr freien Elektronen, welche die Fähigkeit besitzen, zwei- oder mehrwertige Eisenionen zentral über mehrere koordinative Bindungen, stabil in Form von Ringkomplexen zu fixieren.

Sie werden zur Therapie sekundärer Hämochromatosen eingesetzt. Multiple Bluttransfusionen führen hier zur Eisenüberladung. Typische auslösende hereditäre Erkrankungen sind Thalassämien, Sichelzellanämien oder die hereditäre Sphärozytose sowie erworbene Erkrankungen aus dem Formenkreis der myelodysplastischen Syndrome. [44]

Zu den bisher zugelassenen und in der Humanmedizin eingesetzten Substanzen gehören:

Deferoxamin (Desferal®)

Deferoxamin ist ein natürlich vorkommender Eisentransporter (Siderophor) des Bakteriums *Streptomyces pilosus*, welcher die Eigenschaft besitzt ein Eisenatom als stabilen Komplex, dann als Feroxamin bezeichnet, zu binden. Das Handelspräparat Desferal steht nur für die parenterale Gabe zur Verfügung, da es für die Resorption im menschlichen Darm zu groß ist und nur eine sehr geringe Halbwertszeit (5 bis 10 Minuten) aufweist.

Subkutane Infusionen über 8 bis 24 h mit einer Tagesdosis von 500 bis 1000 mg (20 bis 40 mg/kg/Tag) werden als Standarddosierung verabreicht, eine subkutane Bolusgabe hat sich ebenfalls etabliert. Die Elimination erfolgt renal und hepatisch. Unter Therapie kann häufig eine Normalisierung des Eisenspiegels erzielt, und Hämochromatose bedingte kardiale Einschränkungen reduziert werden.

Als Nebenwirkungen können unter anderem Visus- und Hörminderung sowie Neurotoxizität auftreten. [44] [45]

Deferipron (Ferriprox®)

Im Vergleich zu Deferoxamin steht dieses Präparat nur für die orale Applikation zur Verfügung, aufgrund einer kleineren Molekülgröße kann es im Darm resorbiert werden

und gelangt bis zu den intrazellulären Eisenspeichern. Für die Bindung eines Eisensatoms werden drei Deferipron-Moleküle benötigt.

Die Halbwertszeit liegt bei 50 bis 130 Minuten, das Medikament muss daher dreimal täglich per os eingenommen werden.

Unter Therapie mit dem Eisenchelator kann häufig eine kardiale Funktionsverbesserung erzielt werden. Als Nebenwirkungen können Agranulozytose sowie Muskel- und Gelenkschmerzen auftreten. [44] [45]

Deferasirox (Exjade®)

Deferasirox (DFX) hat seit 2006 seine Zulassung in Europa. Jeweils 2 Moleküle Deferasirox können ein Eisenatom binden. Im Gegensatz zu den beiden anderen bekannten Eisenchelatoren hat dieses Medikament eine lange Halbwertszeit von 8 bis 16 Stunden, wodurch eine einmal tägliche orale Applikation möglich ist.

Die primäre Elimination erfolgt über die Leber. [44] [45]

3 Fragestellung

Der Einsatz von Eisenchelatoren als adjuvante Sepsistherapiestrategie wurde in der Vergangenheit mehrfach diskutiert, jedoch liegen aktuell nicht ausreichend Daten vor, um sie als mögliche Therapiealternative zu bewerten.

Zentraler Aspekt der vorliegenden Arbeit sind intravitalmikroskopische Untersuchungen der intestinalen Mikrozirkulation bezüglich der Immunantwort in zwei tierexperimentellen Sepsismodellen.

Hierbei wählten wir zum einen die LPS-induzierte systemische Endotoxinämie und zum anderen die Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)-induzierte, polybakterielle Sepsis, um den Einfluss von zwei neuen Eisenchelatoren, DIBI und MAHMP auf das Intestinum unter experimenteller Sepsis zu evaluieren.

Insbesondere waren für uns die folgenden Fragestellungen von besonderer Relevanz:

1. Hat die systemische Applikation der Eisenchelatoren DIBI bzw. MAHMP Einfluss auf die intestinale Mikrozirkulation gesunder Versuchstiere?
2. Zeigt DIBI bzw. MAHMP antiinflammatorisches Potenzial bei experimenteller Endotoxinämie und sind hierbei Unterschiede zwischen beiden Substanzen nachweisbar?
3. Zeigt DIBI intraperitoneal appliziert antibakterielles Potenzial bei CASP induzierter Sepsis?
4. Weist DIBI Wirksamkeitsunterschiede in den beiden Versuchsmodellen auf?

Zentraler Aspekt aller vier Fragestellungen waren Untersuchungen hinsichtlich Effekte von Eisenchelatoren auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und auf die funktionelle Kapillardichte innerhalb der Mikrozirkulation des Darmes.

4 Material und Methoden

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Rahmen eines viermonatigen Forschungsaufenthaltes an der Dalhousie University in Halifax, Kanada.

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden unter Einhaltung der Richtlinien der kanadischen Tierschutzbehörde (Canadian Council on Animal Care, CCAC) unter äußerster Sorgfalt durchgeführt und unterlagen einer ständigen Kontrolle der lokalen Tierschutzkommission der Carleton Animal Care Facility. Voraussetzung für das experimentelle Arbeiten an Versuchstieren war die erfolgreiche Teilnahme an einer theoretisch-praktischen Prüfung zum Nachweis einer entsprechenden Qualifikation in Versuchstierkunde.

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen erfolgten an 34 männlichen C57BL/6 Mäusen, welche über die Firma Charles River Laboratories International (Wilmington, MS, USA) bezogen wurden. Das Alter der Mäuse betrug zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung 10 bis 12 Wochen und das Gewicht 25 bis 35 g.

Eine standardisierte Tierhaltung wurde durch die Carleton Animal Care Facility sichergestellt und erfolgte in geeigneten, klimatisierten (Temperatur 22°C, Luftfeuchtigkeit 55 bis 60%) Kleintierboxen in Fünfergruppen und bei zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Eine mindestens siebentägige Akklimatisierungsphase nach Anlieferung wurde eingehalten sowie ständig freier Zugang zu Wasser und Kleintiernahrung gewährleistet.

4.1.2 Substanzen

DIBI

DIBI (originale Testsubstanz) ist ein neuer, sich in der Entwicklungsphase befindlicher Eisenchelator mit einem hohen Molekulargewicht, welcher durch die Firma Chelation Partners Inc. (Halifax, NS, Kanada) bereitgestellt wurde. DIBI gehört zur Klasse der Hydroxypyridinon-Eisenchelatoren mit sechsgliedrigem aromatischen Ring, welcher funktionelle Hydroxyl- und Ketongruppen enthält. DIBI ist ein Polymer aus 9 MAHMP-

Monomeren, aufgrund seiner Größe wirkt er vorrangig in extrazellulären Kompartimenten. [46]

In Pulverform angeliefert, wurde er anschließend mit steriler Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) in Lösung gebracht. Für das erste Versuchsmodell wurde eine Dosierung von 10 mg/kgKG intravenös gewählt und für das sich anschließende zweite Modell wurden 40 mg/kgKG intraperitoneal und zusätzlich die i.v Dosierung von 10 mg/kgKG appliziert.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung lag für die Substanz eine Zulassung für tierexperimentelle Forschungszwecke vor. Bereits im Vorfeld durchgeführte *in vivo* Studien der Arbeitsgruppe zeigten am murinen Modell für lokale Anwendungen auf der Cornea eine gute Verträglichkeit sowie ein antiinflammatorisches Potenzial.

Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten als erste systemische Applikation der neuen Substanz *in vivo*.

MAHMP

MAHMP ist das sich ebenfalls in der Entwicklungsphase befindliche Chelat-Monomer des Eisenchelators DIBI, welches im Vergleich zu DIBI ein niedrigeres Molekulargewicht aufweist,

MAHMP wurde ebenfalls durch die Firma Chelation Partners Inc. (Halifax, NS, Kanada) für die Versuchsdurchführung zur Verfügung gestellt.

Der Eisenchelator wurde als vorgefertigte sterile Lösung durch die Firma bereitgestellt, welche den Mäusen in einer Dosierung von 40 mg/kgKG intravenös injiziert wurde. Die gewählte Dosierung des Monomers entspricht einer vergleichbaren Eisenbindungskapazität von DIBI. [46]

4.2 Versuchsablauf

Für den experimentellen Versuchsablauf wurde auf zwei unterschiedliche, bereits gut etablierte Versuchsmodelle zurückgegriffen. Um in einer ersten Phase der Versuchsdurchführung das antiinflammatorische Potenzial von DIBI und MAHMP zu untersuchen, wählten wir das Modell der LPS-induzierten Sepsis. Damit anschließend ein

mögliches antibakterielles Potenzial von DIBI evaluiert werden konnte, wurde für Phase-Zwei das Modell der CASP-induzierten Sepsis benutzt.

4.2.1 LPS-Modell

Nach initialer Anästhesie der Versuchstiere erfolgte eine circa dreißigminütige Präparation, welche die Lagerung, das Monitoring, die chirurgische Anlage des intravasalen Katheters sowie die mediane Laparotomie umfasste. Anschließend wurde über den zentralvenösen Katheter das Endotoxin (bezeichnet als Zeitpunkt $t=0$) und 15 min später, je nach Gruppenzugehörigkeit, einer der beiden Eisenchelatoren bzw. ein Placebo verabreicht. Eine halbe Stunde vor Beginn der Intravitalmikroskopie injizierten wir, die auf Körpertemperatur erwärmten Fluoreszenzfarbstoffe. Nach einer insgesamt zweistündigen Beobachtungszeit, wurde mit der etwa einstündigen Intravitalmikroskopie begonnen. Daraufhin wurde der Exitus mittels intravenöser Pentobarbitalüberdosis eingeleitet und anschließend durch eine terminale Herzpunktion Blut asserviert. Anschließend wurden Gewebeproben des Ileums zur späteren histologischen Untersuchung entnommen.

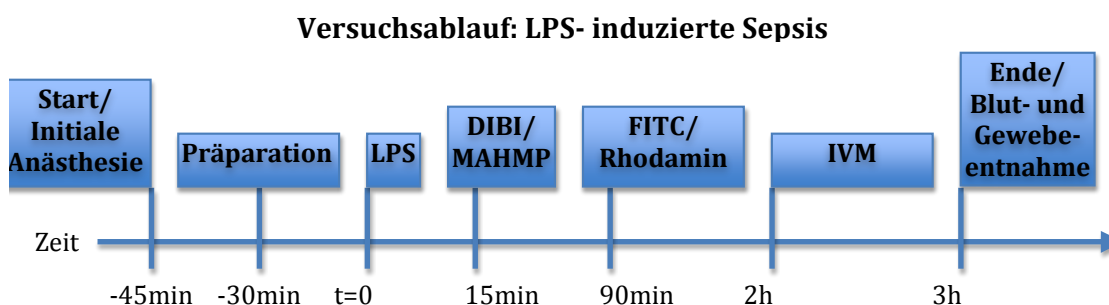


Abb. 4 Versuchsablauf: LPS-induzierte Sepsis

LPS: Lipopolysaccharid, DIBI: hochmolekulargewichtiger Eisenchelator,
 MAHMP: niedrigmolekulargewichtiger Eisenchelator,
 FITC/Rhodamin: Fluoreszenzfarbstoffe, IVM: Intravitalmikroskopie

4.2.2 CASP-Modell

Nach dem 45-minütigen CASP-Operationsverfahren mit intraperitonealer Applikation von DIBI (hier bezeichnet als Zeitpunkt $t=0$), schloss sich nach Narkoseausleitung eine

vierstündige Erholungsphase unter veterinärmedizinischer Aufsicht an. Der weitere Versuchsablauf ähnelte dem Modell der experimentellen Endotoxinämie. Hierbei wurde das Versuchstier initial anästhesiert, präpariert und nach insgesamt 5 Stunden erfolgte eine zweite Gabe des Eisenchelators, nun jedoch über den zentralvenösen Katheter. Nach einer weiteren Stunde Erholungsphase wurde die Intravitalmikroskopie und anschließende Probeentnahme durchgeführt.

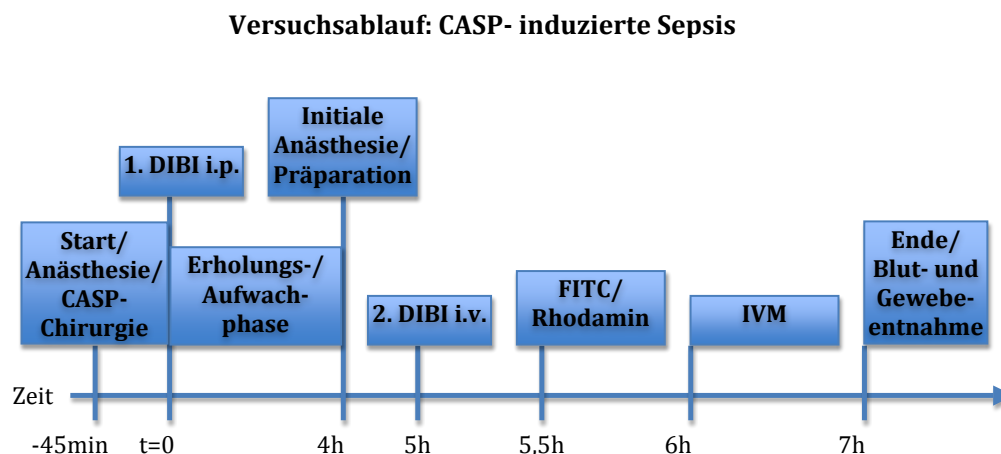


Abb.5 Versuchsablauf: CASP-induzierter Sepsis

CASP: Colon Ascendens Stent Peritonitis,

DIBI: Eisenchelator, FITC/Rhodamin=Fluoreszenzfarbstoffe, IVM=Intravitalmikroskopie, i.p.: intraperitoneal, i.v.: intravenös

4.3 Gruppeneinteilung

Die 34 Versuchstiere wurden in 8 Gruppen eingeteilt (n = 3 bis 5).

- CON-Gruppe
- DIBI-Gruppe
- MAHMP-Gruppe
- LPS-Gruppe
- LPS+DIBI-Gruppe
- LPS+MAHMP-Gruppe
- CASP-Gruppe
- CASP+DIBI-Gruppe

Tiere der Kontrollgruppe (CON-Gruppe) wurden gewichtsadaptiert mit 0,9%-iger Kochsalzlösung (Hospira, Montreal, QC, Canada) als Placebo behandelt.

Entsprechend dem Protokoll der experimentellen Endotoxinämie erhielten Tiere aus der MAHMP-Gruppe sowie aus der DIBI-Gruppe den jeweiligen Eisenchelator (DIBI: 10 mg/kgKG, MAHMP: 40 mg/kgKG) intravenös appliziert.

Tiere der LPS-Gruppe erhielten das Endotoxin (Lipopolysaccharid von *Escherichia coli*, Serotyp O26:B6; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in einer Dosierung von 5 mg/kgKG intravenös injiziert.

In den beiden Behandlungsgruppen (LPS+DIBI-Gruppe und LPS+MAHMP-Gruppe) erfolgte nach Gabe des Endotoxins die intravenöse Applikation des jeweiligen Eisenchelators (DIBI: 10 mg/kgKG, MAHMP: 40 mg/kgKG).

Mit dem zweiten Modell zur Induktion der experimentellen Sepsis (CASP-Modell) ergänzten wir die Versuchsreihe um zwei weitere Gruppen. Hierbei wurde Mäusen der CASP-Gruppe, direkt nach Abschluss der chirurgischen Stenteinlage, gewichtsadaptiert als Placebo das Lösungsmedium des Eisenchelators DIBI (sterile Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)) intraperitoneal, sowie erneut nach weiteren 5 Stunden im „Post-treatment-Design“ intravenös injiziert.

Der Behandlungsgruppe (CASP+DIBI) wurde dementsprechend der Eisenchelator DIBI zum Zeitpunkt t=0 intraperitoneal in einer Dosierung von 40 mg/kgKG und wiederholt nach 5 Stunden in einer Dosierung von 10 mg/kgKG intravenös verabreicht.

4.4 Versuchsdurchführung

4.4.1 Anästhesie und Monitoring

Mittels einer elektronischen Waage erfolgte die Gewichtsbestimmung, anschließend wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 45 mg/kgKG Pentobarbital (Ceva Sante Animale, Montreal, QC, Canada) anästhesiert. Sobald die Wirkung eintrat (nach 5 bis 7 min) konnte mit der Positionierung und Fixierung in Rückenlage auf einer vorgewärmten Heizmatte begonnen werden, um eine Hypothermie des Versuchstieres zu verhindern.

Eine transrektale Temperatursonde wurde eingeführt und diente zur kontinuierlichen Überwachung der Körpertemperatur, welche mittels der Heizmatte konstant auf $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten wurde (Monitor SDI Vet/Ox TM4403, SDI Sensor Devices, USA).

Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte regelmäßig durch den Zwischenzehenreflex, dabei wurden die Zehen der hinteren Extremität fest mit den Fingernägeln gekniffen. Von einer ausreichend tiefen Narkose ist nach Erlöschen dieses Reflexes auszugehen. Bei einer zu geringen Narkosetiefe wurden zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Anästhesie Bolusgaben von 1 mg Pentobarbital bedarfsweise titriert verabreicht.

4.4.2 Chirurgische Präparation

Vor Beginn des operativen Vorgehens wurde sichergestellt, dass eine ausreichende Narkosetiefe vorlag, welche im Allgemeinen 15 Minuten nach Barbituratgabe gegeben war. Mit einem Skalpell (Lance Blades, Sheffield, England) wurde das rechte vordere Halsdreieck sowie der Bauchbereich vorsichtig von Fell befreit und anschließend mit Alkoholtupfern (Health Care, Toronto, ON, Canada) desinfiziert. Mit einer anatomischen Pinzette (Fine Science Tools, North Vancouver, BC, Canada) wurde die Haut oberhalb des rechten Halsdreiecks vorsichtig angehoben und punktuell mit chirurgischer Schere (Fine Science Tools, North Vancouver, BC, Canada) inzidiert, um sie mit einer graziilen, gebogenen Arterienklemme (Fine Science Tools, North Vancouver, BC, Canada) stumpf von der Halsfaszie abpräparieren zu können. Es erfolgte eine Hautinzision 1 cm nach kraniokaudal und die Vena jugularis externa dextra wurde durch stumpfe Präparation aufgesucht und dargestellt. Mit Nahtmaterial wurde die Vene kranial ligiert und eine zweite kaudale Ligatur zur späteren Fixierung des zentralen Jugulariskatheters vorgelegt. Durch Mikroinzision erfolgte die Eröffnung des Gefäßes, anschließend wurde der Polyethylenkatheter (30G, SIMS Portex, London, England) in die Vene eingeführt und durch die vorbereitete Ligatur fixiert. Zum Schutz des Operationsgebietes vor Austrocknung wurde es mit, in warmer physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompressen (Medicon, Montreal, QC, Canada) abgedeckt.

Nach einer Ruhephase erfolgte die Fluoreszenzfarbstoffgabe eine halbe Stunde vor Intravitalmikroskopie. Daraufhin wurde mit der medianen Laparotomie fortgefahren. Hierbei wurde die Haut mit einer anatomischen Pinzette unterhalb des Processus

xiphoideus angehoben, punktuell eröffnet und mit chirurgischer Schere vorsichtig nach kaudal inzidiert. Die nun sichtbare Linea alba diente als Leitstruktur, entlang dieser konnte das Peritoneum sicher 1 bis 2 cm eröffnet werden. Unter Zuhilfenahme befeuchteter Wattestäbchen (Medicon, Montreal, QC, Canada) erfolgte die vorsichtige Lokalisation des Caecums. Das Operationsgebiet wurde anschließend steril, feucht abgedeckt.

Damit die intravitalmikroskopischen Untersuchungen nun vorgenommen werden konnten, musste das Tier auf den vorbereiteten Objektisch des Mikroskops umgelagert werden.

4.4.3 CASP-Operation

An Versuchstieren der CASP-Gruppe und der CASP+DIBI-Gruppe wurden zur Induktion der experimentellen Sepsis folgende chirurgische Maßnahmen modifiziert nach Zantl et al. [47] durchgeführt.

Nach Vorbereitung des Arbeitsplatzes und Wiegen der Maus, wählten wir für die CASP-Chirurgie ein Narkoseverfahren mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (Baxter Corporation, Mississauga, ON, Canada). Hierbei verwendeten wir als Einleitungs-dosis 4 Volumenprozent Isofluran in 2 Liter Sauerstoff pro Minute. Als postoperative Schmerzprophylaxe erfolgte nun die subkutane Applikation von 1mg Ketoprofen (Merial Canada, Baie d'Urfe, QB, Canada). Im Anschluss wurde die Maus in Rückenlage auf einer Wärmematte positioniert und bei erhaltener Spontanatmung zur Narkoseaufrechterhaltung Isofluran mit 1,5 Volumenprozent unter einem eingestellten Sauerstoffflow von 0,8-0,6 zugeführt. Die Überwachung der Körpertemperatur erfolgte äquivalent zur Intravitalmikroskopie. Nach Rasur und Desinfektion wurde die mediane Laparotomie wie bereits unter 4.4.2 beschrieben unter Einhaltung steriler Bedingungen durchgeführt.

Das Operationsgebiet wurde mit feuchtenwarmen Kompressen umgeben, das Zökum mit Wattestäbchen isoliert und das Colon ascendens ausgelagert. Während des gesamten weiteren chirurgischen Vorgehens wurde besonders akribisch auf eine ständige Feuchthaltung des Darmes geachtet. Ungefähr 0,5 cm distal der Ileozökalklappe wurde mit nichtabsorbierbaren 7/0 Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, Deutschland),

ein erster chirurgischer Knoten oberhalb der Darmwand vorgelegt. Anschließend erfolgte die mesenteriale Inzision mit einer 20 G Venenverweilkanüle (B. Braun Vasofix Safety, Melsungen, Deutschland), welche mit einem zweiten Knoten fixiert wurde. Hierbei war es wichtig eine Perforation der gegenüberliegenden Darmwand zu vermeiden. Der Venenverweilkatheter wurde anschließend auf 4 mm gekürzt und intraluminal auf das Vorhandensein von Faeces geprüft.



Abb. 6 Operationssitus während der CASP-Chirurgie

Ausgelagertes Colon ascendens mit faecesgefülltem und mittels Nahtmaterial fixiertem 20G Katheter

Anschließend erfolgte die Rückverlagerung des Intestinums, die intraperitoneale Medikamentenapplikation bzw. die Placebogabe sowie die weitere Flüssigkeitssubstitution von 0,5 ml einer 0,9%-igen NaCl-Lösung intraperitoneal.

Nun konnten die Ränder des Musculus rectus abdominis mittels fortlaufender Nahttechnik adaptiert und hinterher eine kutane Einzelknopfnahnt vorgenommen werden.

Nach Narkoseausleitung wurde das Versuchstier in veterinärmedizinische Beobachtung gegeben. Nach insgesamt 4-stündiger Erholungsphase konnte die Maus zur Vorbereitung auf die Intravitalmikroskopie aus der Animal Care Facility abgeholt und entsprechend des Ablaufplans der experimentellen Sepsis im Labor präpariert werden.

4.5 Intravitalmikroskopie

4.5.1 Technische Daten und Geräte

Folgendes technisches Equipment wurde zur Durchführung der intravitalmikroskopischen Analysen benötigt:

- **Epifluoreszenzmikroskop** (Leica DMLM; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Objektiv (20 x 0,5, Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Filtersatz (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
 - Nr.10 für Beobachtungen mit FITC-Albumin (Anregung: BP 450 - 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565)
 - Nr. 20 für Beobachtungen mit Rhodamin 6G (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: BP 575 - 640)
- Lichtquelle (HBO 50; Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Videokamera (AVT BC-71, AVT-Horn, Aalen, Deutschland)
- Monitor (Toshiba LCD Monitor, Toshiba America Information Systems, USA.)
- Apple Mac Mini
- Software iMovie für Mac OSX
- Infusomat (Abbott Lifecare 5000, Pacific Medical, San Juan Capistrano, Canada)
- Hotline (TM800-5, Level 1 Technologies, Smiths Medical International, USA)

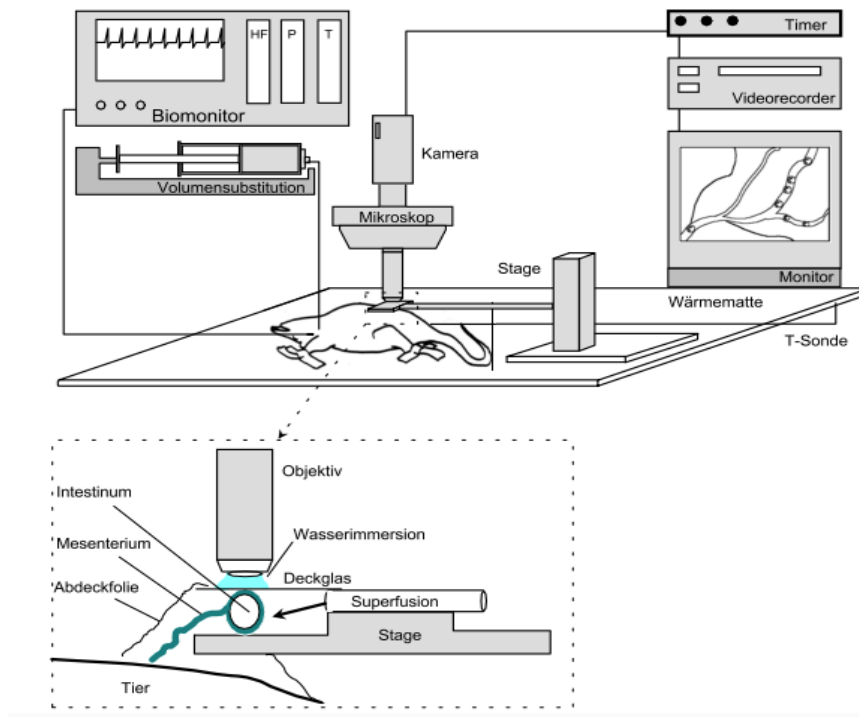


Abb. 7 Versuchsaufbau nach Lehmann [48]

4.5.2 Durchführung

30 Minuten vor Beginn der Intravitalmikroskopie wurden die auf Körpertemperatur erwärmten Fluoreszenzfarbstoffe intravenös injiziert. Verwendet wurden 0,05%-iges Rhodamin-6G (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in einer Dosierung von 1,5 ml/kgKG zur Markierung der Leukozyten und zur kontrastierten Darstellung des Plasmas 5%-iges FITC-Albumin (Fluorescein Isothiocyanate Conjugate, bovine, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) in einer Dosierung von 1 ml/kgKG.

Das bereits laparotomierte Versuchstier wurde auf dem Mikroskopiertisch seitlich, vor ein speziell angefertigtes Plexiglasbecken gelagert. Anschließend erfolgte, unter Zuhilfenahme befeuchteter Wattestäbchen, die vorsichtige Platzierung des terminalen Ileums auf eine Haltevorrichtung innerhalb des Wasserbades. Unter Anwendung des „Hanging Drop“-Modells nach Pavlovic et al. [49] wurde die Darmschlinge mit einer auf 37°C erwärmten, physiologischen NaCl-Lösung superfundiert (Hotline TM800-5, Level 1 Technologies, Smiths Medical International, USA). Dies ermöglichte einerseits ein

möglichst schonendes, physiologisches Milieu für den zu untersuchenden Darmabschnitt zu gewährleisten, und stellte gleichzeitig eine Adhäsion zum darüberliegenden Objektträger her. Zur weiteren Optimierung der mikroskopischen Auflösung dienten einige Tropfen destillierten Wassers als Immersionsflüssigkeit zwischen Objektiv und Objektträger.

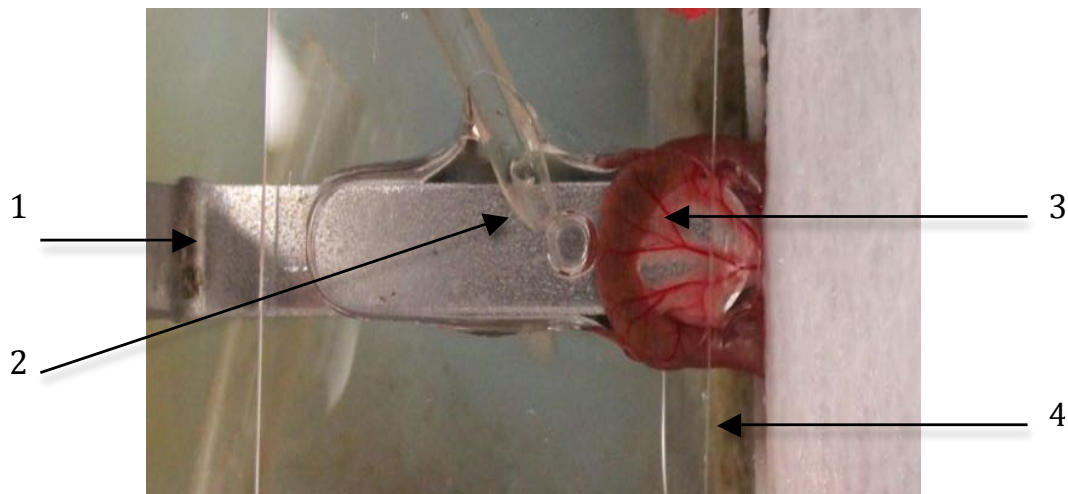


Abb. 8 Hanging Drop im Versuchsmodell (Aufsicht)

(1) Haltevorrichtung für die ausgelagerte Darmschlinge; (2) Superfusionskatheter mit Hanging Drop; (3) terminale Ileumschlinge; (4) Objektträger

Anschließend wurde die Intravitalmikroskopie begonnen. Hierbei wurden 30-sekündige Videosequenzen von jeweils 5 Gesichtsfeldern mittels der Software iMovie aufgenommen und gespeichert.

Zuerst wurde auf Submukosaebene fokussiert, um die Leukozyten-Endothel-Interaktion in den darin verlaufenden Venolen unterschiedlichen Grades zu begutachten (Klassifikation nach Bohlen et al. [50])

- V1: Venolen 1. Grades (submuköse Sammelvenolen)
 - Durchmesser zwischen 60 bis 80 μm
- V3: Venolen 3. Grades (postkapilläre Venolen)
 - Durchmesser zwischen 30 bis 50 μm

Je 5 Gesichtsfelder von möglichst unverzweigten V1- und V3-Venolen wurden mit dem Filtersatz Nr. 20 mikroskopiert und als Videoclip für die spätere offline Leukozytenzählung gespeichert.

Anschließend wurde auf die Ebene der Lamina muscularis fokussiert, um mit dem Filtersatz Nr. 10 den Blutfluss im Bereich des Kapillarstrombettes darstellen zu können. Auch hier wurden je 5 Gesichtsfelder mikroskopiert und als Videosequenz von je 30 Sekunden gespeichert, um später die funktionelle Kapillardichte auswerten zu können. Um in einem letzten Schritt den Blutfluss in den Darmzotten zu untersuchen, erfolgte antimesenterial die elektrokoagulatorische Eröffnung (Geiger cautery unit, Geiger Instrument, Californien, USA) eines möglichst faecesgefüllten, etwa 2 cm langen Darmabschnittes. Mit erwärmter, physiologischer NaCl-Lösung wurde die, nun sichtbare Mukosafläche gespült. Es erfolgte die Aufnahme weiterer 5 Videoclips, die gewählten Analysebereiche befanden sich in möglichst großem Abstand zu den Koagulationsrändern.

Die Gesamtdauer der Intravitalmikroskopie blieb unter einer Stunde.

4.6 Versuchsauswertung

Zur Auswertung der erstellten Videosequenzen wurde die Bildbearbeitungssoftware ImageJ genutzt und ein verblindetes Setting gewählt.

Vor Analyse erfolgte die Kalibrierung des Computerprogramms mittels mikroskopischer Videoaufzeichnungen eines Mikrometereichmaßstabes.

Die adhärenenten Leukozyten wurden sowohl in V1- als auch in V3-Venolen bestimmt. Die Funktionelle Kapillardichte wurde für die Lamina muscularis und Lamina mucosa ermittelt. [51]

4.6.1 Temporär adhärenente Leukozyten

Als temporär mit dem Gefäßendothel interagierend werden jene Leukozyten bezeichnet, welche einen zuvor ausgewählten Gefäßdurchmesser innerhalb von 30 Sekunden passieren (n/min). Hierbei weisen die Leukozyten üblicherweise eine Geschwindigkeit von 50 $\mu\text{m/s}$ auf.

In ImageJ wurde der Durchmesser an einer geeigneten Stelle des Gefäßes eingezeichnet und alle passierenden Leukozyten während einer Videosequenz von 30 Sekunden gezählt.

4.6.2 Fest adhärente Leukozyten

Als fest adhärente Leukozyten werden Leukozyten bezeichnet, welche über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden am Gefäßendothel haften bleiben (n/mm^2). In ImageJ wurde der zu betrachtende Gefäßabschnitt zur Flächenbestimmung polygonal umrandet und die darin enthaltenen Leukozyten durch anklicken gezählt.

4.6.3 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) errechnet sich aus der Summe der sichtbar mit Erythrozyten perfundierten Kapillarlängen innerhalb einer bestimmten Fläche.

Begutachtbar wird dies durch einen Hell-Dunkelkontrast als Resultat des zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran markierten Plasmas, welches sich im Gegensatz zu den dunklen Erythrozyten hell darstellt.

4.7 Histologische Präparate

Direkt nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde 2 cm oral vom Mikroskopierbezirk des terminalen Ileums eine etwa 1 cm lange Darmgewebeprobe entnommen und in 10%-iger Formalinlösung fixiert.

Die Herstellung histologischer Präparate erfolgte eigenständig. Hierbei wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben unter zur Hilfenahme des Mikrotoms in 5 μm dicke Schnittpräparate aufbereitet, welche daraufhin mit Pinzetten auf ein Warmwasserbad platziert wurden. So war es möglich die Schnittpräparate schonend auf einen Objektträger zu befördern. Danach erfolgte die Trocknung bei 37°C und eine anschließende Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

4.7.1 Auswertung

Besonderen Wert wurde während der Untersuchung auf folgende Aspekte gelegt: sind durch eine gestörte Mikrozirkulation mikroskopisch sichtbare Schäden an Zotten und Krypten sowie an Mukosa und Submukosa aufgetreten - hierzu zählte auch das Abheben der Epithelschicht mit resultierender Ausbildung subepithelialer Spalträume sowie das Auftreten von Ablagerungen in der Mukosa.

Um eine Vergleichbarkeit von Ergebnissen zu gewährleisten, musste ein möglicher intestinaler Schaden in Schweregrade eingeteilt werden. Eine etablierte Methode ist die Verwendung der Gradeinteilung des mukosalen Ischämie-Reperfusionsschadens nach Chiu et al. [52]

Tab. 2 Histologische Einteilung der Mukosaschädigung nach Chiu et al. [52]

Grad	Histologisches Korrelat
0	Normale Dünndarmmukosa
1	Auftreten einzelner subepithelialer Spalträume (Grünhagen Raum) an den Zottenspitzen
2	Ausweitung subepithelialer Spalträume mit Epithelabhebungen der oberen Zottenhälfte
3	Ausweitung subepithelialer Spalträume auf die untere Zottenhälfte und Denudation der oberen Zottenhälfte
4	Verstopfte Kapillaren, denudierte Zotten, Hämorrhagien der Payer Plaques und komplette Denudation der Zotten
5	Desintegration der Lamina propria mit ausgeprägten Ulzerationen und Hämorrhagien

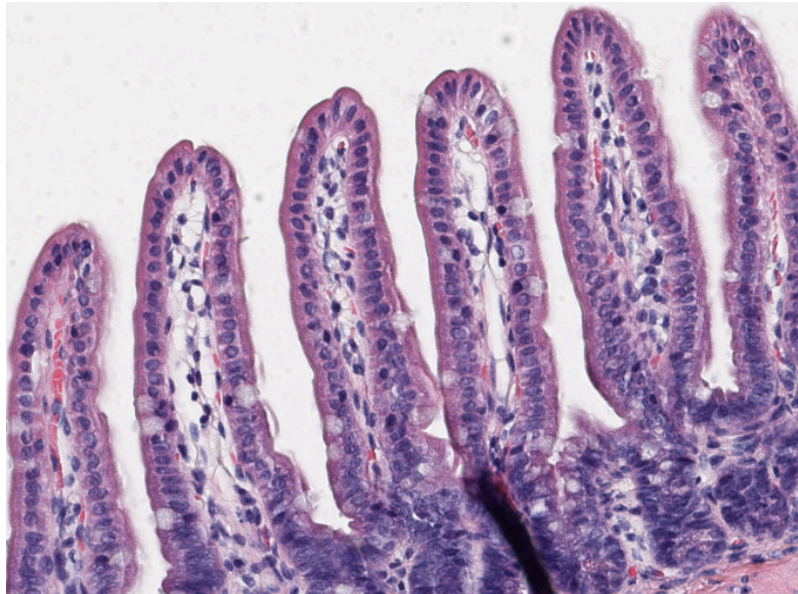


Abb. 9 Histologisches Präparat des Dünndarms, CON-Gruppe
Grad 0 nach Chiu: Normale Dünndarmmukosa

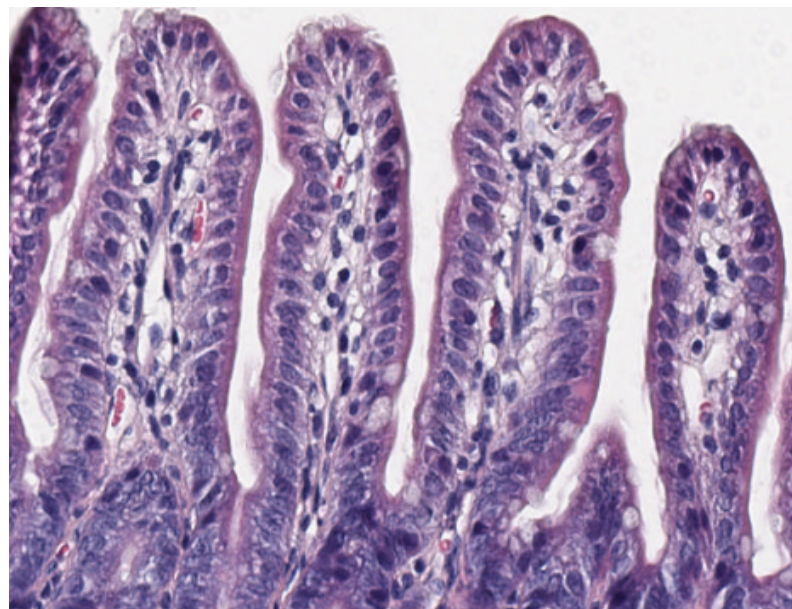


Abb. 10 Histologisches Präparat des Dünndarms, LPS+DIBI-Gruppe
Grad 1 nach Chiu: einzelne subepitheliale Spalträume (Grünhagen Raum) an den Zottenspitzen

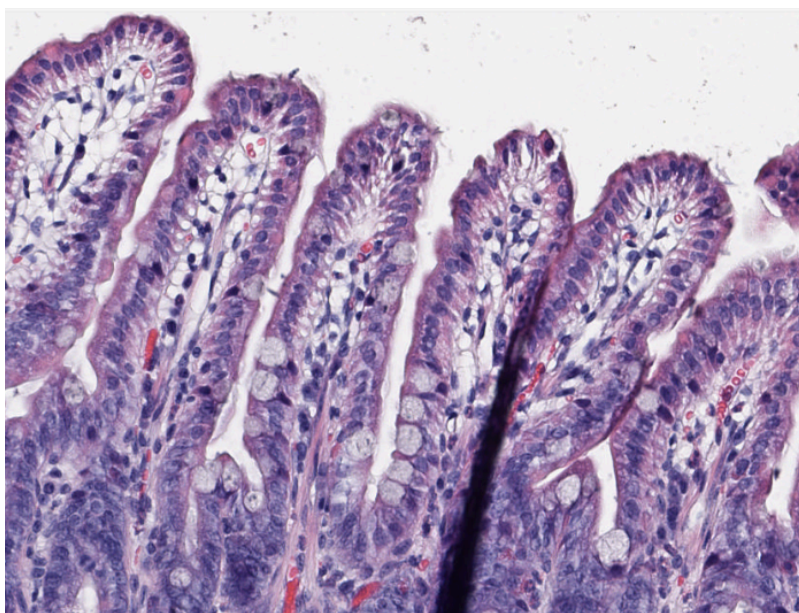


Abb. 11 Histologisches Präparat des Dünndarms, LPS-Gruppe

Grad 2 nach Chiu: Ausweitungen subepithelialer Spalträume mit Epithelabhebungen der oberen Zottenhälfte

4.8 Statistik

Zur graphischen Darstellung und statistischen Auswertung der Daten wurde die Software Prism 6 für Mac OSX (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet.

Hiermit erfolgte zuerst die Berechnung von folgenden Parametern der deskriptiven Statistik: Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und Varianz.

Lag nach *Kolmogorow-Smirnow* eine Normalverteilung vor, wurde mittels Ein-Weg-Varianzanalyse (one-way ANOVA) unabhängiger Stichproben und post-hoc *Holm-Sidak's multiple comparisons* Test eine Analyse der Daten vorgenommen.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ für alle Untersuchungen festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 LPS-Modell

5.1.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Rollerflow

Es zeigte sich sowohl in V1-Venolen, als auch in V3-Venolen eine tendenzielle Reduktion des Baseline-Leukozytenrollings nach Gabe von DIBI. Außerdem wurde ein geringfügiger Anstieg des Rollerflows nach Gabe von MAHMP beobachtet.

Bei Endotoxinämie reduzierte sich die Anzahl der temporär mit dem Gefäßendothel interagierenden Leukozyten pro Minute signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe: in Venolen 1. Ordnung um das Achtzehnfache, in Venolen 3. Ordnung um das Zweiundzwanzigfache.

Der Rollerflow in den Venolen 1. und 3. Ordnung des terminalen Ileums blieb nach Behandlung der Endotoxinämie mit den zwei neuen Eisenchelatoren nahezu unverändert.

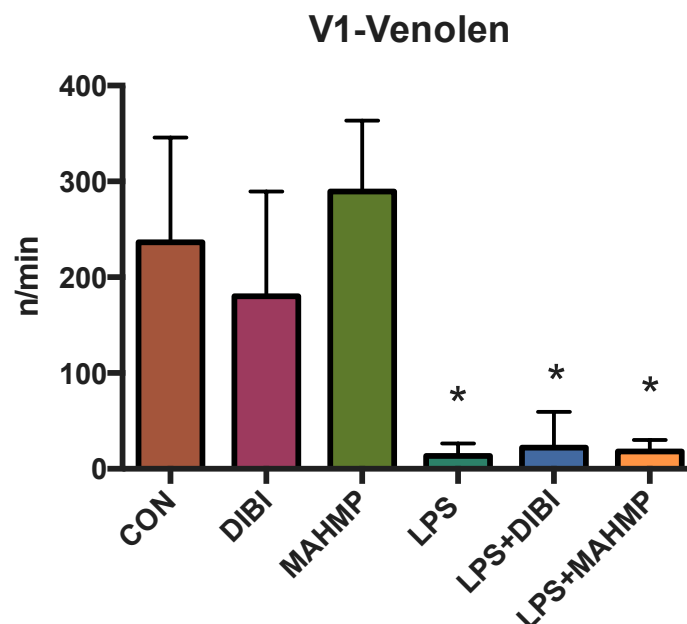


Abb. 12 Anzahl temporär adhärenter Leukozyten (n/min) in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON

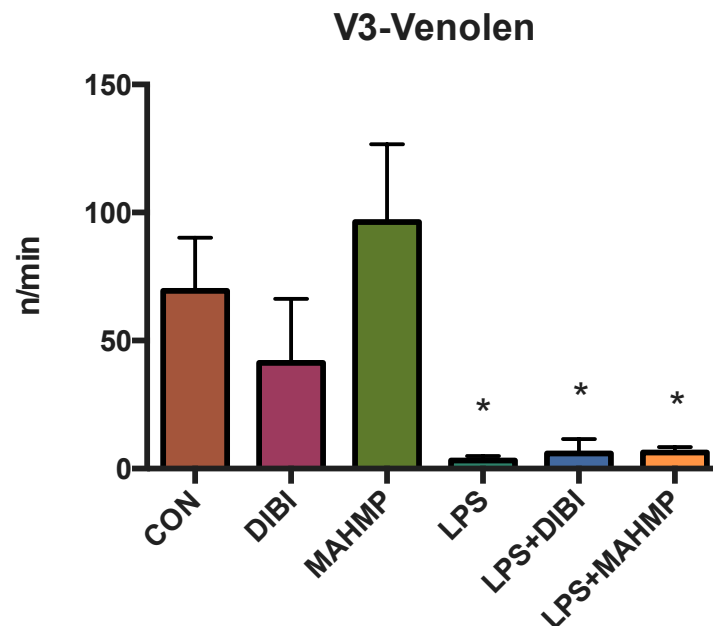


Abb. 13 Anzahl temporär adhärenter Leukozyten (n/min) in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON

Fest Adhärenente Leukozyten

Die Gabe von DIBI bzw. MAHMP hatte keinen Einfluss auf die Baseline-Leukozyten-adhärenz bei Kontrolltieren ohne Endotoxinämie.

Nach LPS-Gabe war in den submukösen Sammelvenolen (V1-Venolen) eine etwa fünffach erhöhte Anzahl fest adhärenter Leukozyten zu beobachten. In den postkapillären Venolen (V3-Venolen) war dies deutlicher ausgeprägt, hier waren fest adhärenente Leukozyten um das Neunfache erhöht.

Es zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten in der LPS+DIBI-Gruppe und etwas stärker betont in der LPS+MAHMP-Gruppe verglichen mit der LPS-Gruppe in V1- und V3-Venolen. Dieser Effekt war deutlicher in den V3-Venolen ausgeprägt, das Signifikanzniveau wurde hier für die LPS+MAHMP-Gruppe versus LPS-Gruppe erreicht. Dies entspricht einer Verringerung der Anzahl adhärenter Leukozyten um 35 % nach MAHMP-Gabe bei experimenteller Endotoxinämie.

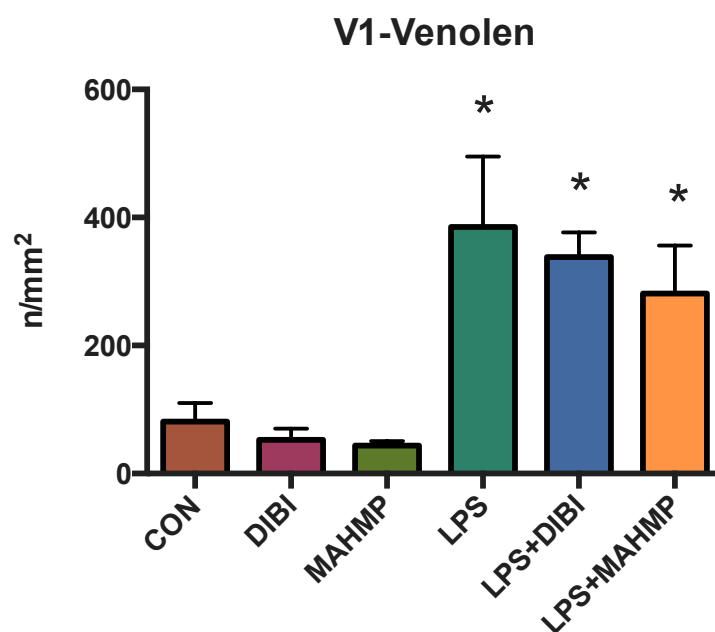


Abb. 14 Anzahl fest adhärenter Leukozyten (n/mm^2) in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON

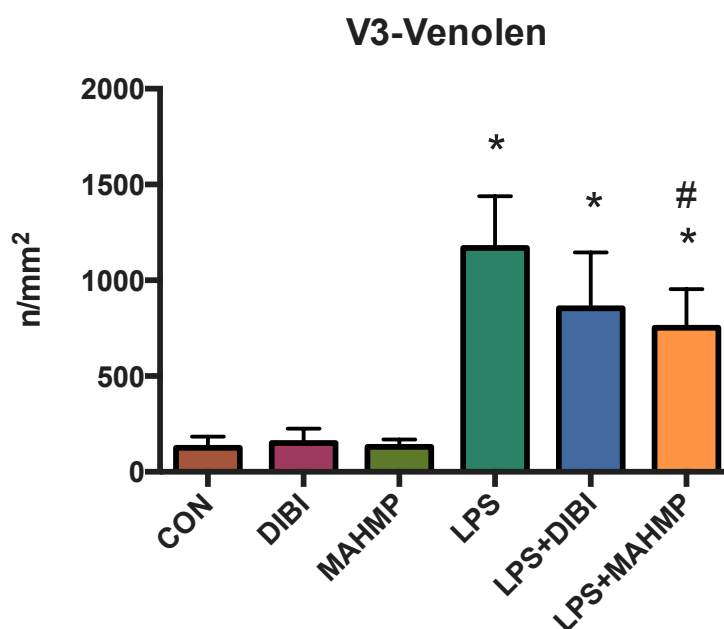


Abb. 15 Anzahl fest adhärenter Leukozyten (n/mm^2) in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON; # ($p < 0,05$) vs. LPS

5.1.2 Funktionelle Kapillardichte

Die Applikation der Eisenchelatoren bei Versuchstieren ohne Endotoxinämie zeigte keine signifikanten Veränderungen der funktionellen Kapillardichte gegenüber der Kontroll-Gruppe. Jedoch konnten wir tendenziell bei gesunden Versuchstieren nach MAHMP-Gabe sowohl in der Lamina muscularis, als auch in der Lamina mucosa eine geringfügig höhere funktionelle Kapillardichte beobachten als vergleichsweise nach DIBI-Gabe zu verzeichnen war.

Bei Endotoxinämie verringerte sich die funktionelle Kapillardichte in den Darmwand-schichten signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe um näherungsweise 50-60 %.

Versuchstiere der Behandlungsgruppen zeigten eine Zunahme der intestinalen, mikrovaskulären Perfusion gegenüber der LPS-Gruppe. In der LPS+DIBI-Gruppe war dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant im Gegensatz zur LPS+MAHMP-Gruppe. Insgesamt war nach Gabe der Eisenchelatoren bei Endotoxinämie eine Zunahme der funktionellen Kapillardichte deutlicher in der Lamina mucosa registrierbar. Hier zeigte sich in der LPS+MAHMP-Gruppe eine Zunahme um 63 % gegenüber der LPS-Gruppe, vergleichend lag der Anteil in der Lamina muscularis nur bei 35 %.

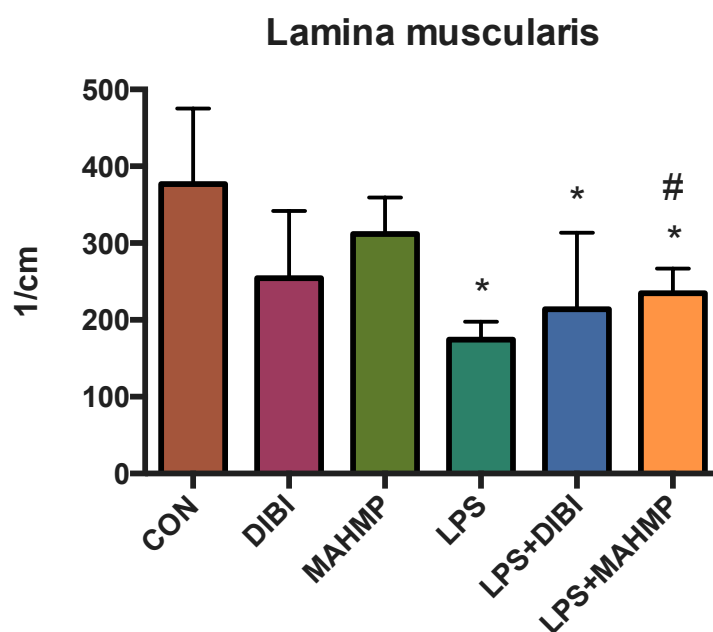


Abb. 16 Funktionelle Kapillardichte (1/cm) in der Lamina muscularis des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON; # ($p < 0,05$) vs. LPS

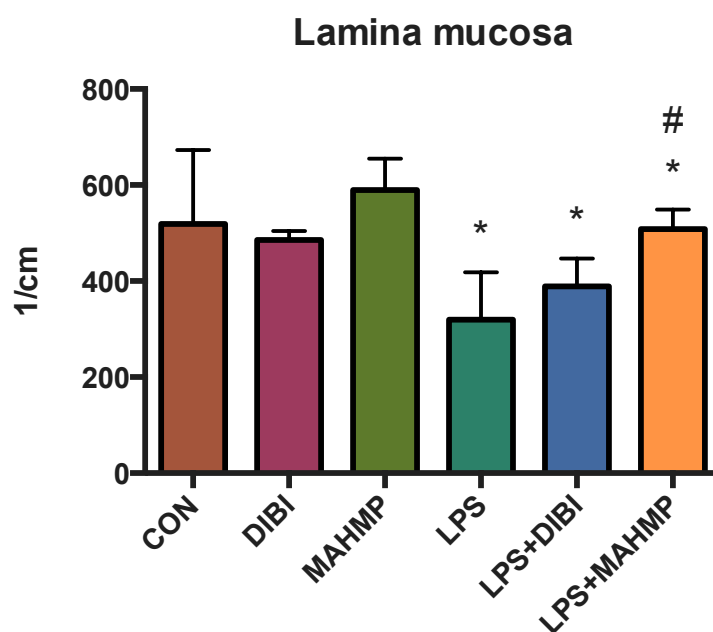


Abb. 17 Funktionelle Kapillardichte (1/cm) in der Lamina mucosa des terminalen Ileums bei experimenteller Endotoxinämie

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON; # ($p < 0,05$) vs. LPS

5.2 CASP-Modell

5.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Rollerflow

Nach Induktion der experimentellen Sepsis zeigten Versuchstiere der CASP-Gruppe eine signifikante Reduktion der Anzahl temporär mit dem Gefäßendothel interagierenden Leukozyten gegenüber der Kontroll-Gruppe. In Venolen 1. Ordnung entsprach dies einer Reduktion um 90% und in Venolen 3. Ordnung um 80%.

Nach Behandlung der septischen Tiere mit DIBI konnten wir eine deutliche Zunahme des Leukozytenrollings beobachten, das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

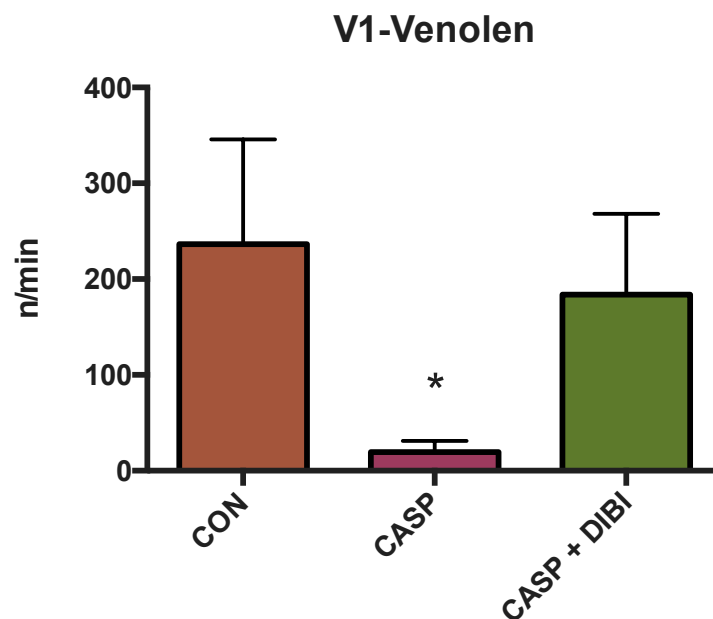


Abb. 18 Anzahl temporär adhärenter Leukozyten (n/min) in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON

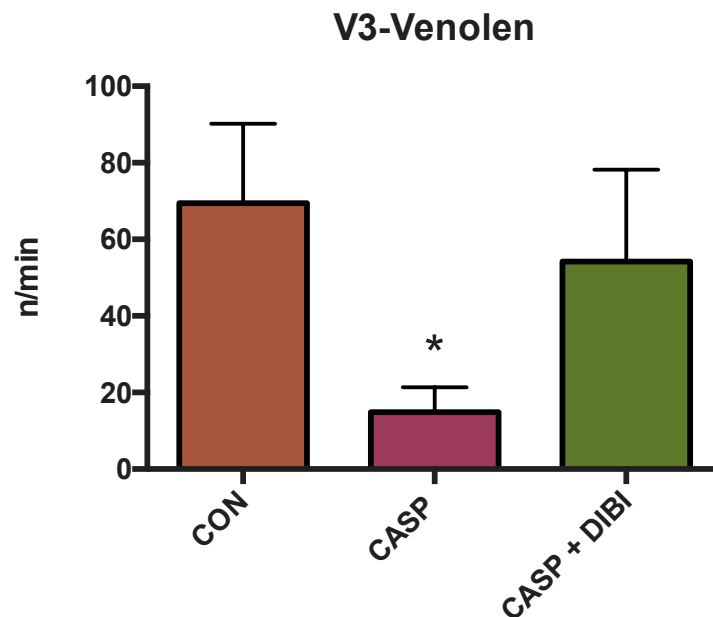


Abb. 19 Anzahl temporär adhärenter Leukozyten (n/min) in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON

Fest Adhärente Leukozyten

In den submukösen Venolen des terminalen Ileums zeigten septische Tiere der CASP-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl adhärenter Leukozyten. Im Vergleich zu Tieren der Kontroll-Gruppe war die Anzahl um mehr als das Fünffache erhöht.

Nach Behandlung der Sepsis mit dem Eisenchelator DIBI beobachteten wir eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten in Venolen unterschiedlichen Grades. Dabei war der Effekt in den V3-Venolen mit 48 % etwas stärker ausgeprägt als in V1-Venolen mit 38 %.

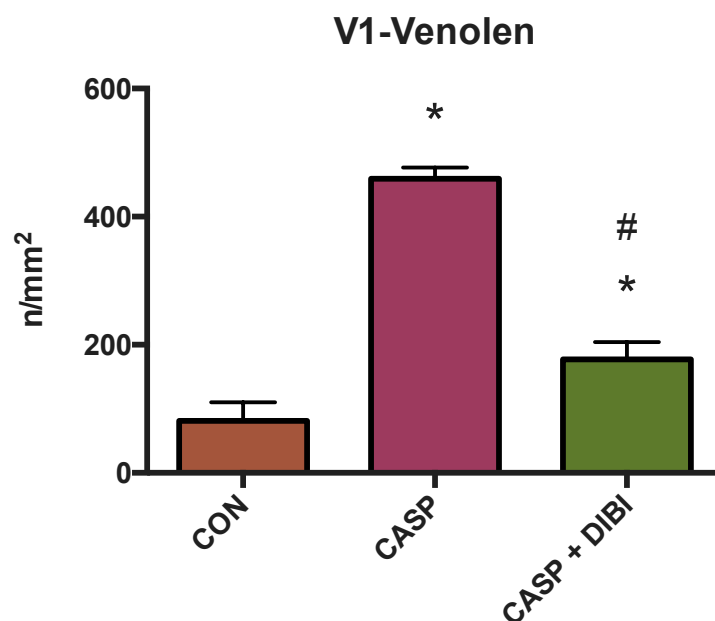


Abb. 20 Anzahl fest adhärenter Leukozyten (n/mm^2) in V1-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON; # ($p < 0,05$) vs. CASP

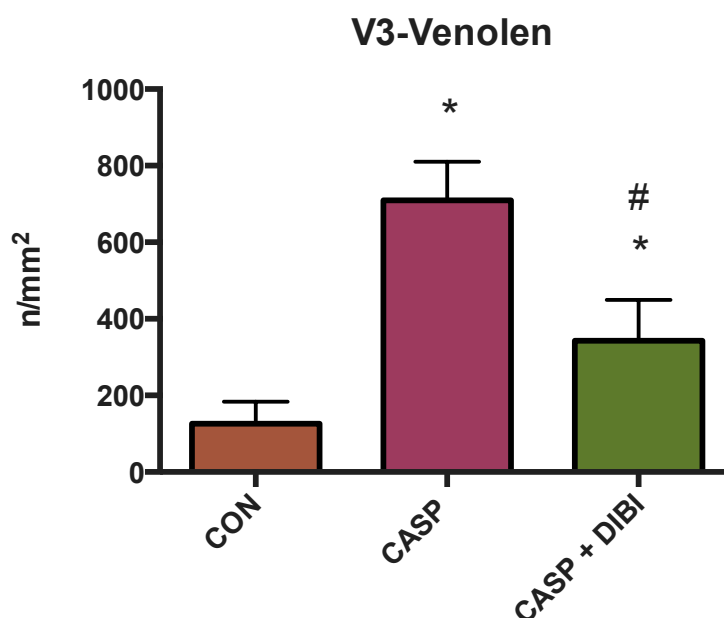


Abb. 21 Anzahl fest adhärenter Leukozyten (n/mm^2) in V3-Venolen des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung; * ($p < 0,05$) vs. CON; # ($p < 0,05$) vs. CASP

5.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Im CASP-Modell konnten weder für die Lamina muscularis noch für die Lamina Mucosa signifikante Veränderungen der intestinalen Perfusion aufgezeigt werden.

Tendenziell wiesen Tiere der CASP-Gruppe nach Induktion der Sepsis eine geringere funktionelle Kapillardichte als gesunde Tiere der Kontroll-Gruppe auf.

Nach Behandlung der septischen Tiere mit dem Eisenchelator DIBI konnte eine geringe Zunahme der funktionellen Kapillardichte in der Lamina muscularis und in der Lamina mucosa beobachtet werden.

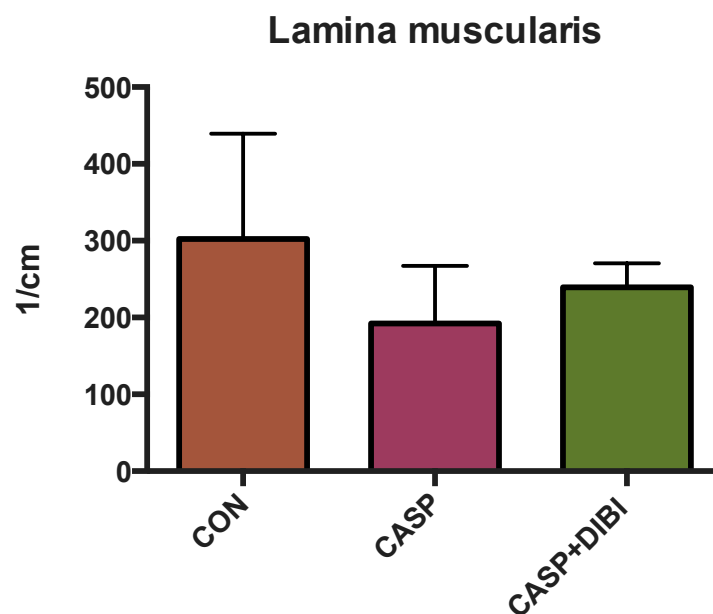


Abb. 22 Funktionelle Kapillardichte (1/cm) in der Lamina muscularis des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung

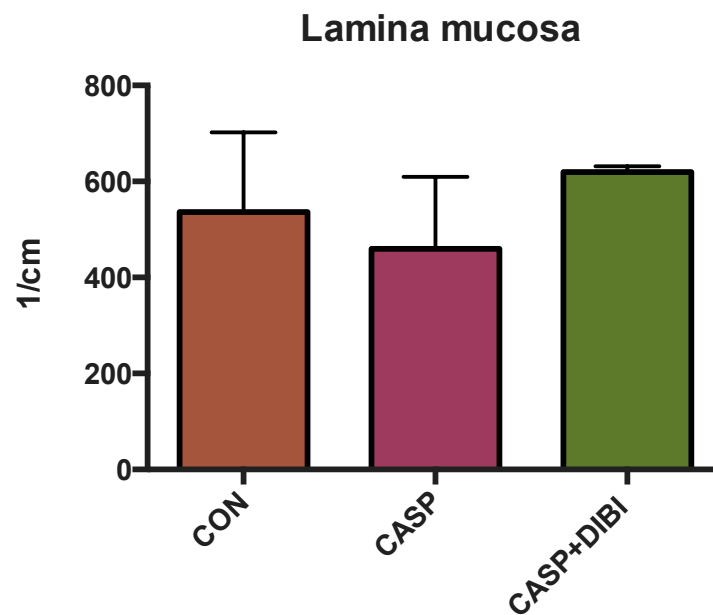


Abb. 23 Funktionelle Kapillardichte (1/cm) in der Lamina mucosa des terminalen Ileums bei experimenteller Sepsis

Mittelwert \pm Standardabweichung

5.3 Histologische Präparate

Entsprechend der histologischen Gradeinteilung nach Chiu et al. [52] wiesen Tiere aus der Kontroll-Gruppe sowie gesunde Tiere aus der MAHMP-Gruppe eine lichtmikroskopisch unauffällige Dünndarmmukosa auf (Grad 0).

Gesunde Tiere in der Behandlungsgruppe mit DIBI zeigten einzelne subepitheliale Spalträume an den Zottenspitzen (Grad 1).

Das stärkste Ausmaß der mukosalen Schädigung wurde bei Versuchstieren der LPS-Gruppe detektiert und entsprechend Grad 2 zugeteilt.

Nach Behandlung der experimentellen Endotoxinämie mit DIBI war das Ausmaß des histologisch sichtbaren Schadens verringert (Grad 1), nach Behandlung mit dem Eisenchelator MAHMP stellte sich die Mukosa unauffällig dar (Grad 0).

Tiere mit chirurgisch induzierter Sepsis (CASP-Gruppe) wiesen geringere Schädigungen der Mukosa (Grad 1) auf als vergleichsweise jene bei experimenteller Endotoxinämie (LPS-Gruppe). Nach Applikation von DIBI zeigten septische Tiere eine histologisch unauffällige Dünndarmmukosa.

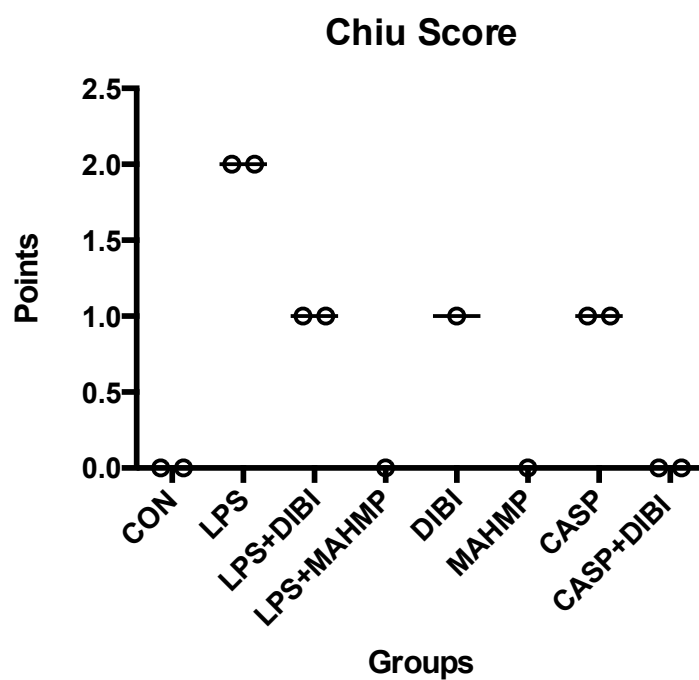


Abb. 24 Histologie: Ausmaß der mukosalen Schädigung in den einzelnen Versuchstiergruppen

Grad 0: Normale Dünndarmmukosa

Grad 1: Auftreten einzelner subepithelialer Spalträume (Grünhagen Raum) an den Zotten spitzen

Grad 2: Ausweitung subepithelialer Spalträume mit Epithelabhebungen der oberen Zottenhälfte

6 Diskussion

6.1 Intravitalmikroskopie im LPS-Modell

6.1.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Im Rahmen der primär physiologischen Abwehrreaktion des Organismus auf eine Entzündungsreaktion werden Immunzellen aktiviert. Hierbei kommt es in der Mikrozirkulation zur Adhäsionsmolekül-vermittelten Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Wobei Leukozyten initial temporär, dann fest mit dem Endothel adhären, um anschließend zum Ort der Entzündungsreaktion ins periphere Gewebe zu transmigrieren. [53]

Rollerflow

Beginnen Leukozyten und Endothel während einer Inflammationsreaktion miteinander zu interagieren, nähern sie sich aus der Blutstrommitte kommend dem Endothel an (Margination). Dies begünstigt eine Selektin-vermittelte, temporäre Adhärenz der Leukozyten mit dem Endothel und wird als Leukozytenrolling bezeichnet. [54] [55]

Im gesunden Organismus, unter physiologischen Gegebenheiten können bis zu 40% der Gesamtleukozyten als rollende Leukozyten vorliegen, dieses „Baseline rolling“ kann als Aktivierungsbereitschaft der Immunzellen im Fall einer erforderlichen Abwehrreaktion gewertet werden. [56]

Die Kontrollgruppe unserer Versuche zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl rollender Leukozyten. *Fiebig* et al. und *Ley* stellten am Mesenterium einen engen Zusammenhang zwischen Gewebeauslagerung und Erhöhung der Anzahl spontan rollender Leukozyten fest. [57] In intravitalmikroskopischen Untersuchungen von *Lehmann* et al. wurden 20 Minuten nach Darmauslagerung Vergleichswerte von 50 Roller pro Minute in submukösen Venolen erhoben. [48] Ähnliche Werte zum Baseline-Rolling zeigten *Scalia* et. al, welche bei 15 bis 20 Roller pro Minute lagen. [58]

Im Durchschnitt lag der Rollerflow in V1-Venolen unserer Kontrollgruppe mit 230 Leukozyten pro Minute deutlich höher als bei anderen Autoren, dies erklärt sich aus einer

längeren Zeit zwischen chirurgischer Präparation und intravitalmikroskopischer Untersuchung (Anlage zentralvenöser Katheter V. jugularis: 130 Minuten vor IVM, mediane Laparotomie und Darmauslagerung: 20 Minuten vor IVM).

Es zeigte sich in unseren Versuchen der Trend einer Reduktion des Rollerflows in der DIBI-Gruppe und ein tendenzieller Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten in der MAHMP-Gruppe. Ob dieser Trend tatsächlich durch Effekte der eingesetzten Eisenchelatoren zu erklären ist, kann bei fehlender Signifikanz nicht abschließend geklärt werden. Um hier eindeutige Aussagen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe zu erhöhen.

Unbehandelte Tiere der LPS-Gruppe wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Rollerflows auf. Erklären lässt sich diese Beobachtung durch die signifikante Zunahme der Anzahl fest adhärenter Leukozyten nach Endotoxingabe. Überproportional viele Leukozyten befinden sich im fortgeschrittenem Stadium der Inflammation in fester Adhärenz mit dem Endothel, sodass zu diesem Zeitpunkt kaum noch rollende Leukozyten beobachtet werden können. [48]

Die mit den zwei neuen Eisenchelatoren behandelten Tiere der LPS-Gruppe wiesen keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl rollender Leukozyten pro Zeiteinheit im Vergleich zur unbehandelten LPS-Gruppe auf. Dies hängt offenbar mit der nur geringfügigen Reduktion der Anzahl festhaftender Leukozyten unter Eisenchelatorbehandlung zusammen. Nur wenig mehr Leukozyten stehen erneut für das Rolling zur Verfügung.

Betrachtet man den Rollerflow vergleichend in Venolen unterschiedlichen Grades (V1- und V3-Venolen), so zeigt dieser gleichgerichtete Ergebnisse in den behandelten und nicht behandelten Kontroll- und Endotoxingruppen, dies verstärkt insgesamt die Aussagekraft der diskutierten Ergebnisse.

Fest adhärente Leukozyten

Neben den überproportional vorhandenen rollenden Leukozyten in der unbehandelten Kontrollgruppe, waren vereinzelt fest adhärente Leukozyten zu beobachten. Diese geringe Aktivierung der Leukozyten, hauptsächlich über Integrin-vermittelte Adhäsion, lässt sich durch eine geringfügige Inflammation aufgrund der chirurgischen Präparation erklären. Ihre Anzahl war vergleichbar mit Angaben aus der Literatur. [29] [59] [60]

Die Kontrollgruppen mit DIBI und MAHMP zeigten keine erhöhten Werte der fest adhären Leukozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, somit blieb die intravenöse Applikation ohne negativen Effekt bezogen auf die Mikrozirkulation. Dies ist von Bedeutung, da es sich hier um den erstmaligen Einsatz der neuen Substanzen *in vivo* handelt.

Die Applikation von Endotoxin induzierte eine signifikante Erhöhung der Anzahl fest am Endothel adhären Leukozyten, wie aus Literaturangaben bekannt. [61] [62] Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in den Untersuchungen in V1-Venolen ein Anstieg der fest adhären Leukozyten um das Fünffache in V3-Venolen und um das Neunfache bei Applikation von LPS (*Escherichia coli*, Serotyp O26:B6) in einer Dosierung von 5 mg/kgKG.

Sardinha et al. beschrieb bei gleicher LPS-Dosierung einen Anstieg der Anzahl fest adhären Leukozyten in V1-Venolen um das Einhundertfache und in V3-Venolen um das Zehnfache. [59] Die höhere Anzahl fest adhären Leukozyten ist am ehesten auf eine längere Zeitspanne zwischen LPS-Applikation und Durchführung der Intravitalmikroskopie zurückzuführen.

Vergleichbar mit unseren Ergebnissen, jedoch widersprüchlich zu den Ergebnissen von *Sardinha* et al. fanden auch andere Arbeitsgruppen eine stärkere Leukozytenadhärenz in V3-Venolen mit kleinerem Durchmesser. [63] [64]

Aufgrund höherer Scherkräfte in Venolen größeren Durchmessers und folglich resultierender Reduktion von Wechselwirkungen zwischen Gefäßendothel und Blutbestandteilen, adhären Leukozyten weniger stark in V1-Venolen als in V3-Venolen. [65]

In behandelten LPS-Gruppen sahen wir eine tendenzielle Reduktion der Anzahl fest adhären Leukozyten. In den V3-Venolen war diese Reduktion für die MAHMP-Gruppe signifikant. Die zuvor beschriebenen veränderten Scherkräfte in Gefäßen kleineren Durchmessers begründen, dass in V3-Venolen resultierende Effekte aus einer Behandlung mit den Eisenchelatoren eher zu detektieren sind.

MAHMP führte zu einer deutlicheren Reduktion der Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie als DIBI. Aufgrund seines niedrigeren Molekulargewichts kann MAHMP im Gegensatz zu DIBI die Zellwand passieren und auch intrazellulär auf die Eisenhomöostase der Leukozyten einwirken. Intrazelluläre Eisenionen katalysieren aufgrund ihrer

Redoxeigenschaften die Produktion von ROS [66], welche wiederum über redox-sensitive Kaskaden zur Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Inflammation führen. [37] [46] [67]

Eine Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten durch MAHMP begründen wir somit durch dessen Fähigkeit, intrazelluläres und extrazelluläres Eisen zu binden [46], mit konsekutiver Reduktion der ROS-Produktion, einer verminderten Aktivierung redoxsensitiver Stoffwechselwege, einschließlich einer geringeren Produktion von Adhäsionsmolekülen. [68] [69] [70]

Dennoch birgt eine exzessive intrazelluläre Aufnahme von eisenbindenden Substanzen potenziell die Gefahr Zelltoxizität und Zelltod zu bedingen, wodurch ein klinischer Einsatz von MAHMP möglicherweise problematisch zu betrachten ist. [71]

Viele bisher in der Humanmedizin eingesetzte Eisenchelatoren, beispielsweise Deferoxamin enthalten als Hauptbestandteil aus Mikroorganismen gewonnene Chelatbildner, die sogenannten Siderophore. Diese werden natürlicherweise von Mikroorganismen produziert, um in Konkurrenz mit dem Wirtsorganismus benötigtes Eisen während der „anemia of infection“ zu binden, und somit eine Balance der eigenen Eisenhomöostase für Stoffwechselprozesse und Zellteilung gewährleisten zu können. [72] [73]

Ein wesentlicher Nachteil im klinischen Einsatz der natürlichen Eisenchelatoren stellt ihre potenzielle Gefahr da, als Xenosiderophore von pathogenen Bakterien für deren Stoffwechselprozesse und eigenes Wachstum, über eine Sekretion spezifischer Proteine als zusätzlichen Virulenzfaktor genutzt zu werden. [74]

Aus Fallberichten ist beispielsweise bekannt, dass unter Deferoxamintherapie bei Thalassemie Patienten mit dem plötzlichen Auftreten einer *Yersinia enterocolitica* Sepsis zu rechnen ist, welches am wahrscheinlichsten auf den virulenzverstärkenden Effekt von Deferoxamin zurückzuführen ist. [75]

So konnten Lesic et al. zeigen, dass diese Gefahr durch synthetische Eisenchelatoren nicht gegeben ist. Hierbei verglichen die Autoren den Eisenchelator Deferiprone, welcher chemische Ähnlichkeit mit MAHMP aufweist, mit Deferoxamin im Hinblick auf dessen mögliches Potenzial das Wachstum von *Yersinia enterocolitica* positiv zu beeinflussen. [75]

Verschiedene Studien belegen, dass bereits bekannte Eisenchelatoren antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. So zeigten Vlahakos et al., dass Deferoxamine, der seit über 40 Jahren eingesetzte natürliche Eisenchelator, im Tiermodell bei SIRS die

Lipidperoxidation abschwächt, Interleukin-6-Spiegel reduziert und somit eine systemische Inflamationsreaktion mildert. [76]

In Untersuchungen von *Li et al.* konnte gezeigt werden, dass Deferoxamine den LPS-induzierten oxidativen Stress durch NADPH-Oxidase reduziert und somit eine Inflamationsreaktion abschwächen kann. [77]

Ähnliche Erkenntnisse fanden auch *Wang et al.*, im murinen Sepsis-Modell reduziert Deferoxamine eine LPS-induzierte Inflammation. Hier führte, wie in unseren Ergebnissen eine Reduktion der intrazellulären Eisenkonzentration zur Reduktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und folglich geringerer Aktivierung redoxsensitiver Inflamationskaskaden. [78]

Beobachtungen von *Lin et al.* zeigten, dass die Behandlung mit einem lipophilen Eisenchelator die LPS-vermittelte Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen blockiert. [79]

6.1.2 Funktionelle Kapillardichte

Die Kapillarperfusion der Mikrozirkulation ist von besonderer Bedeutung während der systemischen Inflammation bei Sepsis, eine unzureichende Perfusion führt zur Gewebehypoxie und Organversagen. [80] [81]

Die Funktionelle Kapillardichte der behandelten Kontrollgruppen zeigte keine signifikanten Veränderungen, somit konnten nach der intravenösen Applikation der neuen Eisenchelatoren keine negativen Effekte auf die Kapillarperfusion im gesunden Organismus beobachtet werden. Eine tendenzielle Zunahme der Kapillarperfusion in der MAHMP-Gruppe konnte sowohl in der Lamina muscularis, als auch in der Lamina mucosa beobachtet werden. Bei fehlender Signifikanz kann jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob Eisenchelatoren im gesunden Organismus tatsächlich eine Zunahme der Kapillarperfusion bedingen und sich somit mögliche positive Effekte auf die intestinale Mikrozirkulation erzielen lassen. Um diesbezüglich genaue Aussagen treffen zu können, wären weitere Untersuchungen zur Erhöhung des Gruppenumfangs notwendig. Aus unseren Beobachtungen lassen sich jedoch keine negativen Effekte von Eisenchelatoren auf die Funktionelle Kapillardichte eruieren.

Die Applikation von LPS führte zu einer signifikanten Reduktion der Kapillarperfusion um etwa 50 bis 60 % in den untersuchten Darmschichten. Im Literaturüberblick lassen sich hierzu konträre Angaben finden.

Bestätigt werden unsere Untersuchungen durch Beobachtungen von *Schmidt* et al. und ebenso von *Yeh* et al., welche nach LPS Gabe eine Reduktion der villösen Perfusion im Rattenmodell um bis zu 60 % aufwiesen. [82] [83]

Ebenso konnten *Nakajima* et al. am murinen Modell zeigen, dass die Kapillarperfusion nach Endotoxingabe deutlich reduziert wurde, eine Stunde nach Applikation von 1,5 mg LPS /kgKG beobachteten sie eine Reduktion der intestinalen Perfusion um 30 % und in einer weiteren Gruppe mit höherer LPS-Dosis (10 mg LPS /kgKG) sogar eine Reduktion um 50 %. [84]

Wie unter 2.2 beschrieben kommt es zur Verschlechterung der intestinalen Mikrozirkulation durch Endotoxin im Sinne eines *circulus vitiosus*, bedingen und verstärken sich dann Endothelschädigung, Leukozyten-Endothel-Interaktion, strukturelle Veränderungen der Erythrozyten mit geringerer Verformbarkeit, Gerinnungsstörungen, „capillary leakage“ mit Austritt proteinreicher intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium und Ödembildung. [85]

Nach Behandlung der Endotoxinämie mit MAHMP konnten wir eine signifikante Verbesserung der intestinalen Perfusion beobachten, in der Lamina muscularis um 30 %, in der Lamina mucosa um 60 %. In Folge der intrazellulären Eisenrestriktion durch MAHMP kommt es zur Reduktion der Leukozytenadhärenz wie unter 6.1.1 beschrieben, wodurch die Fließeigenschaften des Blutes weniger negativ durch die fest am Endothel adhärierenden korpuskulären Blutbestandteile beeinflusst werden und somit weniger Sekundärschäden auftreten. [65] [86]

Eine weitere Begründung der verbesserten Perfusion könnte ein positiver Effekt auf die Verformbarkeit von Erythrozyten in der Mikrozirkulation durch Eisenrestriktion sein. *Kuskonmaz* et al haben im Rattenmodell einen direkten Zusammenhang zwischen Eisenüberladung und einer geringeren Verformbarkeit der Erythrozyten nachgewiesen [87]

Eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verbesserung der Kapillardichte durch DIBI, lässt sich analog zur Diskussion der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch einen unterschiedlichen intra- und extrazellulären Wirkort beider Substanzen erklären, sodass die Effekte von DIBI auf die Kapillarperfusion aufgrund der alleinigen extrazellulären Eisenretention geringfügiger ausgeprägt sind.

Sardinha et al. [59] sowie *Nevière* et al. [88] beobachteten im Tierexperiment unter Endotoxinämie keine Veränderungen der intestinalen Kapillarperfusion, bei ansonsten

eindeutig vorliegender Sepsis (nachgewiesene spezifische Veränderungen hinsichtlich der Leukozyten-Endothelinteraktion, Interleukinspiegel und Serumlaktat), sodass scheinbar eine starke Abhängigkeit bezüglich des Versuchssettings und der angewandten Methoden besteht.

6.2 Intravitalmikroskopie im CASP-Modell

Bei Inflammation und Infektion wird Eisen eine kontroverse Bedeutung zugeschrieben: einerseits benötigen Immunzellen intrazelluläres Eisen zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) – als potenten Mediator zur Eliminierung von Bakterien, andererseits kann eine überschießende Bildung von ROS zu Zell- und Gewebeschäden führen. [6] [7] Eine antibakterielle Wirkung kann auch durch eine Eisenrestriktion im Host erzielt werden. Erstmals wurde 1940 durch *Cartwright et al.*[89] beschrieben, dass der Organismus während einer Infektion mit einer Herabregulierung des frei verfügbaren Eisens reagiert, im Sinne einer natürlichen, körpereigenen Einschränkung der Wachstumsbedingungen für Krankheitserreger. [8]

Paradkar et al. [90] zeigten im Tierversuch an Mäusen, dass Eisenchelatoren Bakterienwachstum limitieren und somit therapeutisches Potenzial für unterschiedlichste bakterielle Infektionen aufweisen können. Diese Hypothese wird durch *Collins* Untersuchungen bekräftigt, in denen eine parenterale, als auch eine orale Applikation von Eisenchelatoren zur Reduktion des intrazellulären Wachstums von Mykobakterien in Makrophagen Tuberkulose-infizierter Mäuse führte. [91]

Nachdem die Eisenchelatoren bei Endotoxinämie antiinflammatorisches Potenzial zeigten, ergab sich für uns die Fragestellung, ob sich dieser günstige Effekt auch in einer CASP-induzierten, polybakteriellen Sepsis darstellen lassen könnte. Hierbei standen ausschließlich Untersuchungen des Eisenchelators DIBI im Mittelpunkt, da MAHMP im Rahmen weiterer Arbeitsgruppen der Firma Chelation Partners Inc. (Halifax, NS, Kanada) intensivierter betrachtet werden sollte.

6.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Wie von mehreren Autoren beschrieben, führt eine CASP-induzierte Sepsis zu einer erhöhten Anzahl der am Gefäßendothel der Endstrombahn haftenden Leukozyten.

[92] [93] [94] [95] In Abhängigkeit vom Ausmaß der festen Adhärenz kann es dabei zu einer Verminderung der Anzahl rollender Leukozyten kommen. Wir konnten 6 Stunden nach CASP-Operation in der unbehandelten CASP-Gruppe eine deutliche Reduktion der Anzahl rollender Leukozyten nachweisen, welche in Venolen erster Ordnung um 90% und in Venolen dritter Ordnung um 80% im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war.

Gegenteilige Beobachtungen machten *Sharawy et al.* [96] und *Al-Banna et al.* [97] im Rattenmodell, hier kam es zu einem deutlichen Anstieg des Rollerflows in der CASP-Gruppe. Dies scheint hauptsächlich an unterschiedlichen Zeitabläufen der Versuche zu liegen. In unserem Versuchsmodell führten wir nach 6 Stunden die Intravitalmikroskopie durch, wohingegen *Sharawy et al.* nach 24 Stunden und *Al-Banna et al.* nach 16 Stunden den Rollerflow betrachteten. Bei kurzer Zeitperiode nach durchgeführter CASP-Operation befinden sich überproportional viele Leukozyten im fortgeschrittenem Stadium der Inflammation in fester Adhärenz mit dem Endothel, sodass zu dem Zeitpunkt kaum noch rollende Leukozyten beobachtet werden können. [48]

Wohingegen in deutlich längeren Versuchsprotokollen der Effekt einer zeitlich verzögerten, durch inflammatorische Kaskaden aktivierten Granulopoese sichtbar wird. Dem Organismus werden hierdurch neue Leukozyten für die Immunantwort zur Verfügung gestellt, demzufolge lässt sich in der Intravitalmikroskopie ein erhöhtes Rolling beobachten. So konnten *Traber et al* zeigen, dass im peripheren Blutbild 8 Stunden nach LPS-Gabe zuvor gesunkene Leukozyten-Zahlen, durch überproportional viele Granulozyten wieder anstiegen. [98]

Die Behandlung der CASP-Tiere mit dem Eisenchelator DIBI führte tendenziell zum Anstieg des Rollerflows. Da Eisenrestriktion offenbar bedingt, dass weniger Leukozyten fest am Endothel haften, stehen diese wieder für das Rolling zur Verfügung. Dies werten wir als Äquivalent einer weniger weit fortgeschrittenen Immunreaktion, bei möglicherweise reduzierter Bakteriämie. Um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können, bedarf es weiterer mikrobiologische Untersuchungen.

Die Anzahl der fest adhärennten Leukozyten stieg in unseren Untersuchungen nach CASP-OP im Vergleich zur Kontrollgruppe auf das Fünffache an, dies entspricht den allgemeinen Angaben aus der Literatur. [92] [93] [94] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung mit DIBI zur signifikanten Reduktion der festen Adhärenz von

Leukozyten am Endothel der Kapillaren führt, im Vergleich zur CASP-Gruppe in V1-Venolen um 38 % und in V3-Venolen um 48 %.

Im Vergleich zum ersten Versuchsmodell (Endotoxinämie) zeigte eine Behandlung mit dem Eisenchelator DIBI im CASP-Modell eine höhere Effektivität. Begründet sein kann dies zum einen durch eine höhere Dosierung und differente Applikationsform des Eisenchelators. Es erfolgte direkt nach CASP-Operation eine intraperitoneale Applikation von 40 mg DIBI /kgKG sowie zusätzlich, eine Stunde vor Intravitalmikroskopie eine intravenöse Bolusgabe von 10 mg DIBI /kgKG, wohingegen bei Endotoxinämie intravenös 10 mg DIBI /kgKG appliziert wurde. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die Eisenrestriktion zu einer Reduktion des Bakterienwachstums im Modell der polybakteriellen Sepsis führt und es somit zu einer geringeren Leukozytenaktivierung kommt. [39] [40] [99] [100] [101] Während bei Endotoxinämie alle Versuchstiere mit einer standardisierten Menge Endotoxin belastet wurden, ist die Pathogenlast bei CASP-induzierter Sepsis vom Bakterienwachstum abhängig, welche durch DIBI vermindert wird.

Untersuchungen von *Holbein* et al. zeigten, dass eine Eisenrestriktion zu einer Reduktion des Wachstums von *Candida albicans*, *Candida vini* und *Staphylococcus aureus* *in vivo* und *in vitro* führte. [102] [103]

In einer Studie von *Coombs* et al. wurde DIBI mit klassischen Eisenchelatoren *in vitro* verglichen. Hierbei untersuchten die Autoren den Einfluss von Eisenrestriktion durch DIBI, MAHMP, Deferiprone und Deferoxamin auf das Wachstum von humanen und murinen Mammakarzinom- und Fibrosarkomzellen, wobei DIBI den größten Effekt zeigte. [104] Dies ist ein Hinweis dafür, dass DIBI im Vergleich zu anderen Eisenchelatoren die stärksten Effekte auf den zellulären Eisenstoffwechsel aufweist. MAHMP ist chemisch vergleichbar mit Deferiprone.

Messarís et al. zeigten im Rattenmodell der Sepsis ebenfalls, dass eine subkutane Applikation von Eisenchelatoren (Deferoxamin) zu verbesserten Überlebensraten führt. [105]

Außerdem reduziert DIBI, wie bereits unter 6.1.1 ausführlich diskutiert, die extrazelluläre Generierung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wodurch über eine Inhibition redoxsensitiver Inflammationskaskaden weniger Mediatoren exprimiert werden und somit weniger Leukozyten fest am Endothel adhären. [100]

In Übereinstimmung mit dieser These zeigten *Ritter* et al., dass bei abdomineller Sepsis im Rattenmodell eine Behandlung mit Deferoxamin zur Reduktion des oxidativen Stresses und folglich zu einer geringeren Leukozytenaktivierung führt. [106]

6.2.2 Funktionelle Kapillardichte

Im CASP-Modell konnten keine signifikanten Unterschiede der Kapillarperfusion aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse stehen zum Teil konträren Beobachtungen der Kapillarperfusion bei experimenteller Sepsis gegenüber. So beobachteten *Islam* et al. [103] und *Al-Banna* et al. [107] eine signifikante Reduktion der funktionellen Kapillardichte nach CASP-Operation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wohingegen andere Autoren keine Veränderung der Kapillarperfusion unter experimenteller Sepsis zeigen konnten. [88] [108]

Tendenziell beobachteten wir eine Reduktion der Kapillarperfusion in der CASP-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit DIBI eine tendenzielle Verbesserung der Kapillarperfusion in unterschiedlichen Darmschichten. Die Aussagekraft ist jedoch als kritisch zu bewerten und ist offensichtlich stark vom gewählten Versuchsmodell abhängig. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Kapillarperfusion, wie bereits unter 6.1.2 ausführlich diskutiert. Eine Reduktion der Anzahl fest adhärenter Leukozyten, wie sie nach Behandlung mit DIBI beobachtet wurde könnte insgesamt die Hauptursache einer Verbesserung der Kapillarperfusion sein. Jedoch können wir einen möglichen Einfluss von Eisenrestriktion auf weitere Faktoren wie Hypoxie, Gewebeödem oder veränderte rheologische Eigenschaften des Blutes nicht ausschließen. [109]

6.3 Histologie

Das Ausmaß des intestinalen Mukosaschadens nach *Chiu* et al. in den histologischen Präparaten war aufgrund der kurzen Zeitdauer unserer Versuchsprotokolle gering ausgeprägt. [52]

Im LPS-Modell beobachteten wir den höchsten Grad einer Gewebeschädigung bei unbehandelten Endotoxin-Tieren. Die Behandlung der Endotoxinämie mit MAHMP wirkte

präventiv hinsichtlich eines Mukosaschadens, sodass Tiere dieser Gruppe histologisch eine intakte Mukosa wie die Kontrollgruppe aufwiesen. Wohingegen in der LPS+DIBI-Gruppe der mukosale Schaden lediglich um einen Punktwert reduziert werden konnte. Im CASP-Modell hingegen führte die Behandlung mit DIBI zur vollständigen Prävention eines Gewebeschadens.

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse unserer anderen Untersuchungen, in denen MAHMP im LPS-Modell aufgrund seiner intra- und extrazellulären Eisenrestriktion effektiver eine überschießende Inflammation regulierte als DIBI mit hauptsächlich extrazellulärer Eisenrestriktion. Wohingegen die Behandlung mit DIBI im CASP-Modell eine polybakterielle Sepsis offensichtlich effektiv beeinflussen konnte. Am ehesten erklären wir dies, aufgrund gleichzeitig vorliegender antibakterieller und anti-inflammatorischer Eigenschaften des neuen Eisenchelators.

In einem Review aus dem Jahr 2000 evaluierten *Quaedackers et al.* die Vielzahl vorhandener Gradingssysteme zur Erfassung des Ausmaßes eines intestinalen Gewebeschadens, da bis dato kein Standard etabliert war. Sie empfehlen die Anwendung des Gradingsystems nach Chui und als zusätzliche Ergänzung ein Scoring nach Park. Dieser beschreibt lediglich höhere Grade einer intestinalen Gewebeschädigung, welche sich nach dem 5. Grad nach Chui anschließen. Das von uns angewandte Gradingssystem stellt somit eine etablierte Methode zur Bewertung eines intestinalen Reperfusionsschadens dar. [110]

6.4 Limitationen

In retrospektiver Analyse sollen in diesem Abschnitt der Arbeit Limitationen, Kritikpunkte und offengebliebene Fragen in Bezug auf Methodik und Übertragbarkeit näher betrachtet werden.

Als unumgängliches Bindeglied der pharmakologischen Forschung zwischen experimentellen *in vitro* und klinischen Studien, untersuchten wir zwei neue Eisenchelatoren am Tiermodell. Dies bot den Vorteil unter reproduzierbaren Bedingungen Kausalitätsuntersuchungen an einem Gesamtorganismus durchzuführen. Die hohe pathophysiologische Komplexität einer Sepsis und ihr uneinheitliches klinisches Erscheinungsbild, wirken sich zwangsläufig auf die Gültigkeit gewonnener Ergebnisse aus. Ergänzend bedingen allgemeine Limitationen von tierexperimentellen Versuchen, wie beispielsweise speziesabhängige Unterschiede in Anatomie, metabolischen Prozessen und allgemeine Reaktionen auf exogene Einflüsse, eine schwierige Übertragbarkeit gesammelter Ergebnisse auf den menschlichen Organismus.

Im klinischen Alltag entwickeln überwiegend Menschen höheren Alters eine Sepsis, welche aufgrund höherer Komplikationsraten eine höhere Sterblichkeit zeigen. [9] [111] Im Widerspruch dazu steht, dass in Tierversuchen im allgemeinen junge Tiere, aufgrund eines geringeren Kostenaufwandes für die Tierhaltung verwendet werden. Ein sinnvoller weiterer Aspekt scheint somit das Einbeziehen älterer Versuchstiere mit gegebenenfalls spezifischen Komorbiditäten zu sein. So zeigten *Turnbull et al.*, dass diese im Sepsismodell eine deutlich höhere Sterblichkeit und geschwächte Immunfunktion aufweisen. [112] [113]

In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Sepsismodelle mit jeweils verschiedenen Vor- und Nachteilen zur Anwendung. [32]

Im LPS-Modell, welches über die Einbringung spezifischer Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien zum septischen Krankheitsverlauf führt, ist von Nachteil, dass nur ein Teil der Immunreaktion stimuliert wird und aufgrund fehlender weiterer bakterieninduzierter Inflammationskaskaden eine deutlich geringere Realitätsnähe als im CASP-Modell besteht. Trotz einiger Nachteile ist das LPS-Modell eine etablierte Methode in der Sepsisforschung und kann eine Vielzahl der Pathomechanismen einer Sepsis hervorrufen. Der überzeugende zeitliche Vorteil, durch eine rasch einsetzende

Immunantwort direkt nach LPS-Applikation begründete unsere Entscheidung zur Anwendung dieses Modells in Hinblick auf die zuvor definierten Fragestellungen. [33] [34] [114]

In der zweiten Phase entschieden wir uns für die Anwendung des etablierten CASP-Modells, welches eine polybakterielle Peritonitis und Sepsis realitätsnah simuliert, wie sie beispielsweise in der Klinik häufig nach Darmperforation oder Anastomoseninsuffizienz auftreten kann und somit im Vergleich zum LPS-Modell eine bessere klinische Übertragbarkeit zeigt. [34] [47]

Im Gegensatz zum CLP-Modell gewährleistet hierbei ein Stent im Kolon die kontinuierliche Abgabe von Faeces zur besseren Reproduzierbarkeit. Hieraus ergibt sich der Vorteil, dass die Krankheitsintensität zum gewissen Maße über den gewählten Stentdurchmesser steuerbar wird und somit zumindest teilweise Einfluss auf die Ausprägung der Sepsis und Mortalität genommen werden kann. [35] [34] [47] [115]

Eine Sepsis entwickelt sich klinisch meist über mehrere Tage bis Wochen. Die Aussagekraft unserer Ergebnisse ist aufgrund einer kürzeren Dauer der experimentellen Sepsis und demzufolge eines nur kurzfristigen Behandlungsregimes limitiert. Wir beurteilten den Einfluss der neuen Eisenchelatoren auf die intestinale Mikrozirkulation bei Endotoxämie nach 2 Stunden und nach CASP-induzierter Sepsis nach 6 Stunden. Somit können wir weder Aussagen über mittelfristige bis langfristige Effekte einer medikamentösen Behandlung, noch über eine Beeinflussung der Mortalität nach experimenteller Sepsis treffen.

Die Methode der Intravitalmikroskopie zur Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und funktionellen Kapillardichte unterliegt einer Reihe von Störfaktoren, wobei insbesondere ein Einfluss der Darmauslagerung, Temperatur- und Blutdruckschwankungen auf die Leukozytenaktivierung nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt stellt die geringe Gruppengröße von $n = 5$ Versuchstieren dar. Aus den erstmaligen *in vivo*-Versuchen konnten jedoch wichtige Informationen und erste Antworten zum Einfluss von Eisenchelatoren auf die intestinale Mikrozirkulation gewonnen werden, welche richtungsweisende Erkenntnisse für nachfolgende Untersuchungen bieten, wobei insbesondere Dosis-Wirkungsstudien von Bedeutung wären, um detaillierte Aussagen über pharmakokinetische Eigenschaf-

ten von DIBI und MAHMP unter experimenteller Sepsis treffen zu können. Hierfür Bedarf es weiterer Studien mit unterschiedlichen Dosierungen und unterschiedlichen Applikationsintervallen der Eisenchelatoren.

Außerdem sind vergleichende Untersuchungen notwendig: zum einen zwischen Eisenchelatoren unterschiedlicher Molekulargröße und zum anderen mit bisher eingesetzten Standardeisenchelatoren, um weitere Aussagen über die Effektivität von Eisenrestriktion im Rahmen der Sepsis und als potenzielle Therapieoption treffen zu können.

Reaktive Sauerstoffspezies, Adhäsionsmoleküle und die Mediatorexpression über NF- κ B-abhängige Signalwege wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und sollten in weiteren Studien mit eingeschlossen werden.

7 Zusammenfassung

Eisen als wichtigstes Spurenelement im menschlichen Körper bedingt, dass für nahezu alle Erkrankungen, insbesondere chronische und akute Entzündungsreaktionen eine fein regulierte Eisenhomöostase von besonderer Bedeutung ist. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von zwei neuen Eisenchelatoren, DIBI und MAHMP auf die intestinale Mikrozirkulation bei experimenteller Sepsis zu evaluieren.

Im Rahmen einer Sepsis können Eisenchelatoren eine mögliche neue Therapieoption darstellen, indem sie zum einen in verschiedenen Kompartimenten freies Eisen binden können, welches folglich nicht mehr zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zur Verfügung steht, und zum anderen die Bioverfügbarkeit freien Eisens für Stoffwechselprozesse und Zellteilung pathogener Keime reduzieren.

Die klinische Relevanz dieser Studie besteht darin, einen Forschungsbeitrag in der Entwicklung neuer Therapieoptionen im Rahmen einer Sepsis zu leisten, welche weiterhin die Medizin und das Gesundheitssystem vor immense Herausforderungen stellt. Zusätzlich ist die Entwicklung neuer Eisenchelatoren relevant, um insbesondere Nebenwirkungen bisher eingesetzter Präparate, kurze Halbwertszeiten, hohe Kosten und mögliches Potenzial zur Induktion von Pathogenitätsfaktoren (Xenosiderophore) minimieren zu können.

Hierzu führten wir, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass dem Intestinum eine besondere Bedeutung in der Entwicklung des septischen Multiorganversagens zugeschrieben wird, intravitalmikroskopische Untersuchungen des Darmes an zwei murinen Modellen der experimentellen Sepsis durch.

Wir konnten zeigen, dass bei Endotoxinämie eine Behandlung mit MAHMP die Leukozytenaktivierung reduziert, die intestinale Kapillarperfusion verbessert und vor einen histologischen Mukosaschaden schützt und somit anti-inflammatorisch wirkt. In diesem Modell zeigte DIBI ähnliche Tendenzen, jedoch mit geringerer Effektivität, was wir hauptsächlich auf die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der beiden Eisenchelatoren zurückführen. MAHMP kann, im Gegensatz zu DIBI aufgrund eines geringeren Molekulargewichts intrazelluläre Kompartimente erreichen und somit in Leukozyten direkten Einfluss auf die Generierung von ROS, als wichtigen Mediator der Immunreaktion nehmen.

Im CASP-Modell führte die Behandlung einer polybakteriellen Peritonitis mit DIBI zur signifikanten Reduktion der Leukozytenaktivierung. Dies begründen wir hauptsächlich durch eine antibakterielle Wirkung von DIBI, welche durch extrazelluläre Eisenrestriktion quantitativ das Bakterienwachstum reduziert, und folglich über eine Reduktion Toxin-vermittelter, intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden sekundär anti-inflammatorisch wirkt.

In weiteren Untersuchungen sollten reaktive Sauerstoffspezies, Adhäsionsmoleküle und die Mediatorexpression über NF- κ B-abhängige Signalwege untersucht werden.

8 Literaturverzeichnis

- [1] H. Minasyan, "Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives," *J. Crit. Care*, vol. 40, pp. 229–242, 2017.
- [2] SepNet Critical Care Trials Group, "Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study," *Intensive Care Med.*, vol. 42, pp. 1980–1989, 2016.
- [3] O. Moerer and M. Quintel, "Definition, epidemiologie und ökonomische aspekten der sepsis bei erwachsenen," *Internist*, vol. 50, no. 7. pp. 788–798, 2009.
- [4] A. Rhodes, L. E. Evans, W. Alhazzani, and E. Al., "Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016," *Intensive Care Med.*, vol. 43, no. 3, pp. 304–377, 2017.
- [5] B. Roche, L. Aussel, B. Ezraty, P. Mandin, B. Py, and F. Barras, "Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity," *BBA - Bioenerg.*, vol. 1827, pp. 923–937, 2013.
- [6] M. Wessling-Resnick, "Iron homeostasis and the inflammatory response.," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 30, pp. 105–22, Aug. 2010.
- [7] H. Wiseman and B. Halliwell, "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer," *Biochem. J.*, vol. 313, pp. 17–29, 1996.
- [8] P. Fraenkel, "Anemia of infection," *Med Clin N Am*, vol. 101, pp. 285–296, 2017.
- [9] J. A. Kempker and G. S. Martin, "The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 37, no. 2. pp. 165–179, 2016.
- [10] R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. H. Schein, and W. J. Sibbald, "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis," in *Chest*, 1992, vol. 101, no. 6, pp. 1644–1655.
- [11] D. E. Fry, "Multiple organ dysfunction syndrome: past, present and future.," *Surg Infect*, vol. 1, no. 3, pp. 153–155, 2000.
- [12] M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J.-D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, and D. C. Angus, "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)," *JAMA*, vol. 315, no. 8, p. 801, Feb. 2016.
- [13] P. Bhattacharjee, D. P. Edelson, and M. M. Churpek, "Identifying Patients With Sepsis on the Hospital Wards," *Chest*, vol. 151, no. 4, pp. 898–907, 2017.
- [14] R. Mittal and C. M. Coopersmith, "Redefining the gut as the motor of critical illness.," *Trends Mol. Med.*, vol. 20, no. 4, pp. 214–23, Apr. 2014.
- [15] C. Ince, "The microcirculation is the motor of sepsis," *Crit. Care* 2005, vol. 9, pp. 13–19, 2005.
- [16] H. Knotzer and W. Hasibeder, "[Microcirculation of intensive care patients. From

- the physiology to the bedside],” *Anaesthetist*, vol. 57, no. 2, pp. 151–164, 2008.
- [17] P. F. Do Amaral Tafner, F. K. Chen, R. R. Filho, T. D. Corrêa, R. C. De Freitas Chaves, and A. S. Neto, “Recent advances in bedside microcirculation assessment in critically ill patients,” *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, vol. 29, no. 2, pp. 238–247, 2017.
 - [18] L. Frey and K. Kesel, “[Significance of perfusion of the gastrointestinal tract in shock],” *Anaesthetist*, vol. 49, no. 5, pp. 446–450, 2000.
 - [19] K. Werdan, H.-P. Schuster, and U. Müller-Werdan, *Sepsis und MODS*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005.
 - [20] J. F. Colbert and E. P. Schmidt, “Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis,” *Clinics in Chest Medicine*, vol. 37, no. 2, pp. 263–275, 2016.
 - [21] M. Lipinska-Gediga, “Sepsis and septic shock – is a microcirculation a main player?,” *Anestezjol. Intens. Ter.*, vol. 48, no. 4, pp. 261–265, Oct. 2016.
 - [22] K. N. Iskander, M. F. Osuchowski, D. J. Stearns-Kurosawa, S. Kurosawa, D. Stepien, C. Valentine, and D. G. Remick, “Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding,” *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 3, pp. 1247–88, 2013.
 - [23] I. . László, D. . Trásy, Z. . Molnár, and J. . Fazakas, “Sepsis: From Pathophysiology to Individualized Patient Care,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, 2015.
 - [24] J. E. Gotts and M. A. Matthay, “Sepsis: pathophysiology and clinical management,” *BMJ*, vol. 353, no. 6, p. i1585, 2016.
 - [25] E. Siddall, M. Khatri, and J. Radhakrishnan, “Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management,” *Kidney Int.*, vol. 92, no. 1, pp. 37–46, Jul. 2017.
 - [26] D. J. Stearns-Kurosawa, M. F. Osuchowski, C. Valentine, S. Kurosawa, and D. G. Remick, “The Pathogenesis of Sepsis,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 6, pp. 19–48, 2011.
 - [27] A. R. Novotny, D. Reim, V. Assfalg, F. Altmayr, H. M. Friess, K. Emmanuel, and B. Holzmann, “Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis,” *Immunobiology*, vol. 217, pp. 616–621, 2011.
 - [28] M. Schnoor, P. Alcaide, M.-B. Voisin, and J. D. van Buul, “Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, p. 946509, 2015.
 - [29] J. Tang and C. A. Hunt, “Identifying the rules of engagement enabling leukocyte rolling, activation, and adhesion,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 6, no. 2, p. e1000681, Feb. 2010.
 - [30] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh, “Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated,” *Nat. Rev. Immunol.*, 2007.
 - [31] H. F. Galley, “Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis,” *Br. J.*

- Anaesth.*, vol. 107, no. 1, pp. 57–64, 2011.
- [32] L. F. Poli-de-Figueiredo, A. G. Garrido, N. Nakagawa, and P. Sannomiya, “Experimental Models of sepsis and their clinical relevance,” *Shock*, vol. 30, no. Suppl 1, pp. 53–59, 2008.
 - [33] S. L. Zanotti-Cavazzoni and R. D. Goldfarb, “Animal Models of Sepsis,” *Critical Care Clinics*, vol. 25, no. 4, pp. 703–719, 2009.
 - [34] E. Lilley, R. Armstrong, N. Clark, P. Gray, P. Hawkins, K. Mason, N. Lo, A. Stark, S. K. Jackson, C. Thiernemann, and M. Nandi, “Refinement of animal models of sepsis and septic shock,” *Shock*, vol. 43, no. 4, pp. 304–316, 2015.
 - [35] L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, and C. Libert, “Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?,” *Trends Microbiol.*, vol. 19, pp. 198–208, 2011.
 - [36] G. Löffler and P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 8. Auflage. Springer Verlag Heidelberg, 2007.
 - [37] E. Gammella, S. Recalcati, and G. Cairo, “Dual Role of ROS as Signal and Stress Agents: Iron Tips the Balance in favor of Toxic Effects,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
 - [38] I. V. Milto, I. V. Suhodolo, V. D. Prokopieva, and T. K. Klimenteva, “Molecular and Cellular Bases of Iron Metabolism in Humans.,” *Biochem. Biokhimiia*, vol. 81, no. 6, pp. 549–64, 2016.
 - [39] M. D. Knutson, “Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, no. 31, pp. 12735–12743, 2017.
 - [40] T. Ganz and E. Nemeth, “Iron homeostasis in host defence and inflammation,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 8, pp. 500–510, 2015.
 - [41] S. Waldvogel-Abramowski, G. Waeber, C. Gassner, A. Buser, B. M. Frey, B. Favrat, and J. D. Tissot, “Physiology of iron metabolism,” *Transfus. Med. Hemotherapy*, vol. 41, no. 3, pp. 213–221, 2014.
 - [42] L. Tandara and I. Salamunic, “Iron metabolism: current facts and future directions,” *Biochem. Medica*, vol. 22, no. 3, pp. 311–28, 2012.
 - [43] G. J. Anderson and D. M. Frazer, “Current understanding of iron homeostasis,” *AJCN*, no. C, pp. 1–8, 2017.
 - [44] N. Gattermann, “Therapie mit Eisenchelatoren,” *Hämotherapie*, vol. 12, pp. 4–21, 2009.
 - [45] A. Shander, M. D. Cappellini, and L. T. Goodnough, “Iron overload and toxicity: The hidden risk of multiple blood transfusions,” *Vox Sang.*, vol. 97, no. 3, pp. 185–197, 2009.
 - [46] T. Thorburn, M. Aali, L. Kostek, C. LeTourneau-Paci, P. Colp, J. Zhou, B. Holbein, D. Hoskin, and C. Lehmann, “Anti-inflammatory effects of a novel iron chelator, DIBI, in experimental sepsis,” *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, pp. 1–10, 2017.
 - [47] N. Zantl, A. Uebe, B. Neumann, H. Wagner, J. R. Siewert, B. Holzmann, C. D. Heidecke, and K. Pfeffer, “Essential role of gamma interferon in survival of colon

- ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis.," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 5, pp. 2300–9, May 1998.
- [48] C. Lehmann, „Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie“, *Habilitationsschrift*, pp. 1–189, 2000.
- [49] D. Pavlovic, H. Frieling, K.-S. Lauer, V. H. Bac, J. Richter, M. Wendt, C. Lehmann, T. Usichenko, K. Meissner, and M. Gruending, "Thermostatic tissue platform for intravital microscopy: 'the hanging drop' model.," *J. Microsc.*, vol. 224, no. Pt 2, pp. 203–10, Nov. 2006.
- [50] H. Bohlen and R. Gore, "Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies," *Microvasc. Res.*, vol. 11, pp. 103–110, 1976.
- [51] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, 2012.
- [52] C. J. Chiu, A. H. McArdle, R. Brown, H. J. Scott, and F. N. Gurd, "Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal.," *Arch. Surg.*, vol. 101, no. 4, pp. 478–83, Oct. 1970.
- [53] E. S. Wittchen, "Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration.," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 14, pp. 2522–45, Jan. 2009.
- [54] K. Ley and T. F. Tedder, "selectin-mediated attachment and rolling. endothelium. New insights into Leukocyte interactions with vascular," *J Immunol J. Immunol. by guest*, vol. 155, pp. 525–528, 1995.
- [55] K. Buscher, S. B. Riese, M. Shakibaei, C. Reich, J. Dernedde, R. Tauber, and K. Ley, "The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 18, pp. 13490–13497, 2010.
- [56] H. N. Mayrovitz, "Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice.," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 1 Pt 2, pp. H157–H161, 1992.
- [57] K. L. Yamaki, "An approach for studies of mediator-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 123, pp. 381–389, 1998.
- [58] R. Scalia, V. E. Armstead, A. G. Minchenko, and A. M. Lefer, "Essential Role of P-Selectin in the Initiation of the Inflammatory Response Induced by Hemorrhage and Reinfusion," *J. Exp. Med*, vol. 189, no. 6, pp. 931–938, 1999.
- [59] J. Sardinha, M. E. M. Kelly, J. Zhou, and C. Lehmann, "Experimental Cannabinoid 2 Receptor-Mediated Immune Modulation in Sepsis," *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, pp. 1–7, 2014.
- [60] I. Burkovskiy, J. Zhou, and C. Lehmann, "Experimental cannabinoid 2 receptor inhibition in CNS injury-induced immunodeficiency syndrome," *Microcirculation*, vol. 1, no. 902, p. 283-292, 2016.
- [61] D. E. Doherty, L. Zagarella, P. M. Henson, and G. S. Worthen, "Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell.," *J. Immunol.*, vol. 143, no. 11, pp. 3673–9, Dec. 1989.

- [62] J. T. Toguri, R. Moxsom, A. M. Szczesniak, J. Zhou, M. E. M. Kelly, and C. Lehmann, "Cannabinoid 2 receptor activation reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion in the iridial microvasculature during systemic inflammation," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 61, no. 2, pp. 237–249, Sep. 2015.
- [63] J. Birnbaum, E. Klotz, C. D. Spies, O. V. Hein, K. Mallin, R. Kawka, S. Ziemer, and C. Lehmann, "The combinations C1 esterase inhibitor with coagulation factor XIII and N-acetylcysteine with tirilazad mesylate reduce the leukocyte adherence in an experimental endotoxemia in rats.," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 40, no. 3, pp. 167–76, 2008.
- [64] N. A. Al-Banna, D. Pavlovic, V. H. Bac, K. Utpatel, E. Janke, J. N. Rippke, M. Borowiak, V. Cerny, A. Spassov, B. Johnston, T. B. Issekutz, and C. H. Lehmann, "Acute administration of antibiotics modulates intestinal capillary perfusion and leukocyte adherence during experimental sepsis," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 41, no. 6, pp. 536–543, Jun. 2013.
- [65] S. Miura, H. Imaeda, H. Shiozaki, I. Kurose, D. Fukumura, H. Tashiro, H. Serizawa, M. Suematsu, E. Sekizuka, and M. Tsuchiya, "Attenuation of endotoxin-induced intestinal microcirculatory damage by eicosapentanoic acid.," *Am. J. Physiol.*, vol. 264, no. 5 Pt 1, pp. G828–34, May 1993.
- [66] L. T. van Eijk, S. Heemskerk, R. W. van der Pluijm, S. M. van Wijk, W. H. M. Peters, J. G. van der Hoeven, M. Kox, D. W. Swinkels, and P. Pickkers, "The effect of iron loading and iron chelation on the innate immune response and subclinical organ injury during human endotoxemia: A randomized trial," *Haematologica*, 2014.
- [67] T. J. Vachharajani, J. Work, A. C. Issekutz, and D. N. Granger, "Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 278, no. 5, pp. H1613–7, May 2000.
- [68] K. D. Patel, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, R. P. McEver, and T. M. McIntyre, "Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils.," *J. Cell Biol.*, vol. 112, no. 4, pp. 749–59, Feb. 1991.
- [69] D. Tighe, R. Moss, and D. Bennett, "Cell surface adrenergic receptor stimulation modifies the endothelial response to SIRS. Systemic Inflammatory Response Syndrome.," *New Horiz.*, vol. 4, no. 4, pp. 426–42, Nov. 1996.
- [70] H. F. Langer and T. Chavakis, "Leukocyte – endothelial interactions in inflammation," *J. Cell. Mol. Med*, vol. 13, no. 7, pp. 1211–1220, 2009.
- [71] C. W. SMITH, "Possible Steps Involved in the Transition to Stationary Adhesion of Rolling Neutrophils: A Brief Review," *Microcirculation*, vol. 7, no. 6, pp. 385–394, Dec. 2000.
- [72] R. Cusnir, C. Imberti, R. C. Hider, P. J. Blower, and M. T. Ma, "Hydroxypyridinone Chelators: From Iron Scavenging to Radiopharmaceuticals for PET Imaging with Gallium-68.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 1, p. 116, Jan. 2017.
- [73] K. Jomova and M. Valko, "Advances in metal-induced oxidative stress and human disease," *Toxicology*, vol. 283, no. 2–3, pp. 65–87, May 2011.
- [74] J. R. Sheldon and D. E. Heinrichs, "Recent developments in understanding the

- iron acquisition strategies of gram positive pathogens.," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 592–630, Jul. 2015.
- [75] B. Lesic, J. Foulon, and E. Carniel, "Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of *Yersinia enterocolitica*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, no. 6, pp. 1741–5, Jun. 2002.
- [76] D. Vlahakos, N. Arkadopoulou, G. Kostopanagiotou, S. Siasiakou, L. Kaklamanis, D. Degiannis, M. Demonakou, and V. Smyrniotis, "Deferoxamine Attenuates Lipid Peroxidation, Blocks Interleukin-6 Production, Ameliorates Sepsis Inflammatory Response Syndrome, and Confers Renoprotection After Acute Hepatic Ischemia in Pigs," *Artif. Organs*, vol. 36, no. 4, pp. 400–408, 2012.
- [77] L. Li and B. Frei, "Iron chelation inhibits NF-kappaB-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22(phox) protein expression and NADPH oxidase activity.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 12, pp. 2638–43, Dec. 2006.
- [78] S. Wang, C. Liu, S. Pan, Q. Miao, J. Xue, J. Xun, Y. Zhang, Y. Gao, X. Duan, and Y. Fan, "Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and protects against endotoxic shock in mice," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 465, no. 2, pp. 305–311, 2015.
- [79] M. Lin, R. A. Rippe, O. Niemelä, G. Brittenham, and H. Tsukamoto, "Role of iron in NF-kappa B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages.," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, no. 6 Pt 1, pp. G1355–64, Jun. 1997.
- [80] C. Jung, F. Jung, and M. Kelm, "The microcirculation in hypoxia: The center of the battlefield for oxygen.," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 63, no. 3, pp. 169–72, Sep. 2016.
- [81] T. R. McCurdy, A. L. Patrick, L. J. Eltringham-Smith, V. Bhakta, W. P. Sheffield, and A. E. Fox-Robichaud, "Alpha-1 Acid Glycoprotein Reduces Hepatic Leukocyte Recruitment in Murine Models of Either Early Endotoxemia or Early Sepsis," *Microcirculation*, vol. 21, no. 1, pp. 74–83, Jan. 2014.
- [82] H. Schmidt, A. Secchi, R. Wellmann, A. Bach, H. B. Hrér, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Effect of Endotoxemia on Intestinal Villus Microcirculation in Rats," *J. Surg. Res.*, vol. 61, pp. 521–526, 1996.
- [83] Y.-C. Yeh, C.-Y. Wu, Y.-J. Cheng, C.-M. Liu, J.-K. Hsiao, W.-S. Chan, Z.-G. Wu, L. C.-H. Yu, and W.-Z. Sun, "Effects of Dexmedetomidine on Intestinal Microcirculation and Intestinal Epithelial Barrier in Endotoxemic Rats," *Anesthesiology*, vol. 125, no. 2, pp. 355–367, Aug. 2016.
- [84] Y. NAKAJIMA, N. BAUDRY, J. DURANTEAU, and E. VICAUT, "Microcirculation in Intestinal Villi," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 164, no. 8, pp. 1526–1530, Oct. 2001.
- [85] I. H. Sarelius, J. M. Kuebel, J. Wang, and V. H. Huxley, "Macromolecule permeability of in situ and excised rodent skeletal muscle arterioles and venules.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, no. 1, pp. H474–80, Jan. 2006.
- [86] S. Hayashi, R. Takamiya, T. Yamaguchi, K. Matsumoto, S. J. Tojo, T. Tamatani, M. Kitajima, N. Makino, Y. Ishimura, and M. Suematsu, "Induction of heme

- oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme.," *Circ. Res.*, vol. 85, no. 8, pp. 663–71, Oct. 1999.
- [87] K. Sm, Kara H, C. Fm, Kucuk A, and Arslan M, "Effects of iron overload and exenatide on erythrocyte deformability in a rat model," *Sci. Ed. Bratisl Med J*, vol. 116, no. 12, 2015.
- [88] R. R. Nevière, M. L. Pitt-Hyde, R. D. Piper, W. J. Sibbald, and R. F. Potter, "Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats.," *Am. J. Physiol.*, vol. 276, no. 4 Pt 1, pp. G933-40, Apr. 1999.
- [89] G. E. Cartwright, "The anemia of infection.," *J Clin Invest.*, vol. 28, no.1, pp. 86-98, Jan. 1949
- [90] P. N. Paradkar, I. De Domenico, N. Durchfort, I. Zohn, J. Kaplan, and D. M. Ward, "Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages," *Blood*, vol. 112, no. 3, pp. 866–874, 2008.
- [91] H. L. Collins, "The role of iron in infection with intracellular bacteria.," *Immunol Lett*, vol. 85, no. 2, pp. 193–195, 2003.
- [92] M. K. Lustig, V. H. Bac, D. Pavlovic, S. Maier, M. Gründling, O. Grisk, M. Wendt, C.-D. Heidecke, and C. Lehmann, "Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes.," *Shock*, vol. 28, no. 1, pp. 59–64, Jul. 2007.
- [93] C. Lehmann, J. Zhou, L. Schuster, F. Götz, A. Wegner, V. Cerny, D. Pavlovic, and G. S. Robertson, "Effect of Deletion of cIAP2 on Intestinal Microcirculation in Mouse Endotoxemia and Polybacterial Sepsis," *Shock*, vol. 41, no. 5, pp. 454–457, May 2014.
- [94] C. Fuchs, E. Ladwig, J. Zhou, D. Pavlovic, K. Behrend, S. Whynot, O. Hung, M. Murphy, V. Cerny, and C. Lehmann, "Argatroban administration reduces leukocyte adhesion and improves capillary perfusion within the intestinal microcirculation in experimental sepsis," *Thromb. Haemost.*, vol. 104, no. 5, pp. 1022–1028, Aug. 2010.
- [95] N. Sharawy, S. Ribback, N. Al-Banna, C. Lehmann, H. Kern, M. Wendt, V. Cerny, F. Dombrowski, and D. Pavlovic, "Estradiol receptors agonists induced effects in rat intestinal microcirculation during sepsis," *Microvasc. Res.*, vol. 85, pp. 118–127, Jan. 2013.
- [96] N. Sharawy, D. Pavlovic, M. Wendt, V. Cerny, and C. Lehmann, "Evaluation of the effects of gender and estradiol treatment on the intestinal microcirculation during experimental sepsis.," *Microvasc. Res.*, Jul. 2011.
- [97] N. Al-Banna, D. Pavlovic, V. Bac, K. Utpatel, E. Janke, J. Rippke, M. Borowiak, V. Cerny, A. Spassov, B. Johnston, T. Issekutz, and C. Lehmann, "Acute administration of antibiotics modulates intestinal capillary perfusion and leukocyte adherence during experimental sepsis," *Int. J. ...*, vol. 41, pp. 536–543, 2013.
- [98] D. L. Traber, J. T. Flynn, D. N. Herndon, H. Redl, G. Schlag, and L. D. Traber, "Comparison of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model.," *Circ. Shock*, vol. 27, no. 2, pp. 123–

- 38, Feb. 1989.
- [99] H. F. Galley, "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis," *Br. J. Anaesth.*, vol. 107, no. 1, pp. 57–64, Jul. 2011.
 - [100] T. S. Koskenkorva-Frank, G. Weiss, W. H. Koppenol, and S. Burckhardt, "The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 1174–1194, 2013.
 - [101] J. E. Cassat and E. P. Skaar, "Cell Host & Microbe Iron in Infection and Immunity," *Cell Host Microbe*, vol. 13, pp. 509–519, 2013.
 - [102] B. E. Holbein and R. Mira de Orduña, "Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 307, no. 1, pp. 19–24, Jun. 2010.
 - [103] S. Islam, S. Jarosch, J. Zhou, M. del C. Parquet, J. T. Toguri, P. Colp, B. E. Holbein, and C. Lehmann, "Anti-inflammatory and anti-bacterial effects of iron chelation in experimental sepsis," *J. Surg. Res.*, vol. 200, no. 1, pp. 266–273, Jan. 2016.
 - [104] M. R. Power Coombs, T. Grant, A. L. Greenshields, D. J. Arsenault, B. E. Holbein, and D. W. Hoskin, "Inhibitory effect of iron withdrawal by chelation on the growth of human and murine mammary carcinoma and fibrosarcoma cells," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 99, no. 2, pp. 262–70, Oct. 2015.
 - [105] E. Messaris, P. T. Antonakis, N. Memos, E. Chatzigianni, E. Leandros, and M. M. Konstadoulakis, "Deferoxamine administration in septic animals: improved survival and altered apoptotic gene expression," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 4, no. 3, pp. 455–9, Mar. 2004.
 - [106] C. Ritter, M. E. Andrades, A. Reinke, S. Menna-Barreto, J. C. F. Moreira, and F. Dal-Pizzol, "Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis," *Crit. Care Med.*, vol. 32, no. 2, pp. 342–9, Feb. 2004.
 - [107] N. Al-Banna, D. Pavlovic, and N. Sharawi, "Combination of dehydroepiandrosterone and orthovanadate administration reduces intestinal leukocyte recruitment in models of experimental sepsis," *Microvasc. ...*, vol. 95, pp. 82–87, 2014.
 - [108] T. J. VanderMeer, H. Wang, and M. P. Fink, "Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock," *Crit. Care Med.*, vol. 23, no. 7, pp. 1217–26, Jul. 1995.
 - [109] D. De Backer, D. Orbegozo Cortes, K. Donadello, and J.-L. Vincent, "Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock," *Virulence*, vol. 5, no. 1, pp. 73–79, Jan. 2014.
 - [110] J. S. L. T. Quaedackers, R. J. Beuk, L. Bennet, A. Charlton, M. G. A. Oude Egbrink, A. J. Gunn, and E. Heineman, "An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel," in *Transplantation Proceedings*, 2000, vol. 32, no. 6, pp. 1307–1310.
 - [111] W. N. K. A. van M. & R. M. S. Rob G. H. Driessen, Marcel C. G. van de Poll,

- Marianne F. Mol, "The influence of a change in septic shock definitions on intensive care epidemiology and outcome: comparison of sepsis-2 and sepsis-3 definitions," *Infect. Dis. (Auckl)*., 2017.
- [112] I. R. Turnbull, J. J. Wlizek, D. Osborne, R. S. Hotchkiss, C. M. Coopersmith, and T. G. Buchman, "Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture.," *Shock*, vol. 19, no. 4, pp. 310–3, Apr. 2003.
- [113] I. R. Turnbull, T. G. Buchman, P. Javadi, C. A. Woolsey, R. S. Hotchkiss, I. E. Karl, and C. M. Coopersmith, "Age disproportionately increases sepsis-induced apoptosis in the spleen and gut epithelium.," *Shock*, vol. 22, no. 4, pp. 364–8, Oct. 2004.
- [114] H. Redl, S. Bahrami, G. Schlag, and D. L. Traber, "Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia.," *Immunobiology*, vol. 187, no. 3–5, pp. 330–45, Apr. 1993.
- [115] S. Maier, T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Hüser, B. Holzmann, A. Stier, K. Pfeffer, and C.-D. Heidecke, "Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis.," *Shock*, vol. 21, no. 6, pp. 505–11, Jun. 2004.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Greifswald, 18.12.2017

Unterschrift

10 Danksagung

Im Zusammenhang mit der Entstehung dieser Arbeit möchte ich folgenden Personen danken:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Hahnenkamp und Herrn Prof. Dr. med. Taras U-sichenko für die Ermöglichung der Dissertation innerhalb der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Greifswald.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Lehmann, meinem Doktorvater, wissenschaftlichen Mentor und Freund, für die Vergabe des Promotionsthemas und die einmalige Möglichkeit zur Durchführung der Experimente im Forschungslabor des Departments of Anaesthesia der Dalhousie University in Halifax, Kanada. Seine Geduld und sein Engagement sowie seine konstruktive Kritik und Fachkompetenz, welche er in großem Umfang mit in diese Arbeit hat einfließen lassen, haben maßgeblich zur Vollendung der vorliegenden Dissertation beigetragen.

Den Mitarbeitern, Freunden und Kollegen im Microcirculation Lab des Tupper Buildings der Dalhousie University für die herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die geduldige Einarbeitung, ihr offenes Ohr für Fragen und anregende Diskussionen, für wissenschaftliche Ratschläge und technische Unterstützung, vor allem aber für ihre Gastfreundschaft und ihre besondere Persönlichkeit. Insbesondere möchte ich Dr. Ronald Stewart, Sara Whynot, Nancy McGrath, Dr. Juan Zhou, Dr. Nivin Sharawy, Dr. Tom Toguri, Joel Sardhina und Ian Burkovskiy danken.

Meiner Familie und meinen Freunden, für ihre liebevolle, stetige Unterstützung, ihr unerschöpfliches Interesse an meinen Vorhaben und ihren Glauben an die Umsetzung meiner Träume. Sie haben mich stets in dem bestärkt und ermutigt, was ich mir vorgenommen habe.

Von ganzem Herzen sei hiermit Ihnen und all denen gedankt, die mich auf meinem bisherigen Werdegang begleitet und unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Lisanne Kostek, geboren 14.09.1987 in Demmin

Schul Ausbildung

08/1998 - 07/2007 Musikgymnasium des Goethegymnasiums Demmin
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium

10/2007 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Studium der Humanmedizin

08/2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2013 - 08/2013 Dalhousie University Halifax, Canada,
Department of Anaesthesia, Promotionsstudentin

Praktisches Jahr

08/2013 - 10/2013 Innere Medizin: Kardiologie, Universität Greifswald

10/2013 - 12/2013 Innere Medizin: Notfall, Spital Linth, Uznach (Schweiz)

12/2013 - 04/2014 Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universität Greifswald

04/2014 - 07/2014 Chirurgie, Universität Greifswald

11/2014 Erfolgreicher Abschluss des Studiums der Humanmedizin

Praktische Tätigkeiten

11/2010 - 12/2014 Studentische Hilfskraft
Praxis für Pränataldiagnostik Greifswald

09/2012 - 06/2014 Studentische Hilfskraft Universitätsklinikum Greifswald
Sonderwachen

Seit 11/2014 Dozententätigkeit bei Start-ED Notfallmedizinkurs und
Medilearn Notarztkurs

01/2015 - 06/2015 Mitarbeiterin im Simulationszentrum Klinik für Anästhesio-
logie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Greifswald

07/2015 – 12/2017 Assistenzärztin Zentrum für Notfallmedizin
Zentrale Notaufnahme
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Greifswald, 18.12.2017